

CITATION 3

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-35085

⑬ Int. Cl. 5

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)2月5日

C 12 N 15/30
A 61 K 39/012
C 07 K 3/20

ZNA
AFH

8829-4C

※

審査請求 未請求 請求項の数 29 (全53頁)

⑮ 発明の名称 コクシジウム症ワクチンとして有用な組換え及び天然B群アイメリア・テネラ免疫原

⑯ 特 願 平1-8424

⑰ 出 願 平1(1989)1月17日

優先権主張 ⑱ 1988年1月15日 ⑲ 米国(US) ⑳ 145,802

㉑ 発 明 者 ヘレン ブロフオウス アメリカ合衆国, 10309 ニューヨーク, スタテン アイ
ユケルカ ランド, ボブラー アヴェニュー 39

㉒ 出 願 人 メルク エンド カム アメリカ合衆国, ニュージャージー, ローウェイ, イース
パニー インコーポレ ト リンカーン アヴェニュー 126
ーテッド

㉓ 代 理 人 弁理士 岡部 正夫 外3名

最終頁に続く

明細書の浄書(内容に変更なし)

明 細 書

1. 発明の名称 コクシジウム症ワクチンとして
有用な組換え及び天然B群アイ
メリア・テネラ免疫原

2. 特許請求の範囲

1. クローンSO9、SO24、SO7又は
SO1からなる群から選択されるアイメリア
チネラのB型免疫原をコードするヌクレオチ
ド配列の全部又は一部に実質的に相当するヌ
クレオチド配列を包含している組換え体
DNA分子。
2. アイメリアチネラのB型免疫原がSO7と
称される請求項1記載の組換え体DNA分子。
3. DNA配列が、第2DNAヌクレオチド配
列によって直線に続き、実際に付加されて融
合DNA分子が生じる請求項1記載の組換え
体DNA分子。
4. DNA配列がCheYタンパク質及びリンキ
ングヌクレオチドの生成物を発現する請求項
3記載の第2DNA配列。

5. B型クローンSO9、SO24、SO7又
はSO1からなる群から選択されるアイメリ
アチネラの免疫原の免疫原性を表示する少な
くとも1種のタンパク質として発現すること
ができるヌクレオチド配列を包含している組
換え体DNA分子。

6. DNA配列が第2DNAヌクレオチド配列
によって直線に続き実際に付加されて融合
DNA分子が生じる請求項5記載の組換え体
DNA分子。

7. DNA配列がCheYタンパク質及びリンキ
ングヌクレオチドの生成物を発現する請求項
6記載の第2DNA配列。

8. アイメリアチネラのB型免疫原がSO7-
CheYと称される請求項6記載のDNA分子。

9. 宿主細胞に組込まれる場合、DNA配列が
免疫原DNAの全部又は一部を発現すること
ができる発現ベクターに含まれる請求項1、
3又は6記載のいずれかの組換え体DNA分
子。

10. B型クローンSO9、SO24、SO7又はSO1からなる群から選択されたB型DNA分子によって発現されるアミノ酸配列を包含している組換え体アイメリアテネラタンパク質免疫原及びそのマイクロ不均質又はサブユニット免疫原形態。

11. B型免疫原がSO7と称される請求項10記載の組換え体タンパク質免疫原。

12. 少なくとも以下のアミノ酸配列

10

Leu-Ala-Pro-Thr-Phe-Ser-Pro-Ala-Leu-Arg-Ser-Ser-

20

Ser-Ser-Ser-Ser-Ser-Ser-Ser-Ser-Lys-Met-Ala-Asp-

30

Leu-Phe-Ser-Gly-Leu-Val-Gly-Gly-Val-Val-Gly-Ala-

40

Val-Ala-Ala-Ala-Asp-Leu-Pro-Ala-Glu-Gly-Glu-Arg-

140

Gly-Lys-Gln-Gly-Ala-Glu-Cys-Leu-Leu-Arg-Ser-Ser-

150

Lys-Leu-Ala-Leu-Glu-Ala-Leu-Leu-Glu-Gly-Ala-Arg-

160

Val-Ala-Ala-Thr-Arg-Gly-Leu-Leu-Leu-Val-Glu-Ser-

170

Ser-Lys-Asp-Thr-Val-Leu-Arg-Ser-Ile-Pro-His-Thr-

180

Gln-Glu-Lys-Leu-Ala-Gln-Ala-Tyr-Ser-Ser-Phe-Leu-

190

Arg-Gly-Tyr-Gln-Gly-Ala-Ala-Ala-Gly-Arg-Ser-Leu-

200

Gly-Tyr-Gly-Ala-Pro-Ala-Ala-Ala-Tyr-Gly-Gln-Gln-

50

Ala-Pro-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Thr-Ala-Trp-Thr-Cys-

60

70

Cys-Cys-Ser-Lys-Leu-Gln-Glu-Gly-Ala-Arg-Glu-Leu-

80

Glu-Gly-Phe-Val-Gln-Gln-Leu-Ser-Phe-Val-Ala-Gly-

90

Lys-Leu-Ala-Cys-Cys-Leu-Arg-Val-Gly-Ala-Glu-Gln-

100

Leu-Ala-Arg-Cys-Ala-Ala-Glu-Gly-Arg-Leu-Pro-Ser-

110

Ser-Ser-Ser-Ser-Ser-Ser-Cys-Cys-Ala-Leu-Leu-Gln-

120

130

Leu-Glu-Lys-Gln-Asp-Leu-Glu-Gln-Ser-Leu-Glu-Ala-

220

Gln-Gln-Pro-Ser-Ser-Tyr-Gly-Ala-Pro-Pro-Ala-Ser-

230

Ser-Gln-Gln-Pro-Ser-Gly-Phe-Phe-Trp

を包含しているB型アイメリアテネラタンパク質免疫原及びそのマイクロ不均質又はサブユニット免疫原形態。

13. タンパク質が組換え技術により生産される請求項12記載のB型アイメリアテネラ免疫原。

14. 請求項12記載のアミノ酸配列に付加されるリンキングタンパク質によって付加されたCheY融合タンパク質を包含している組換え体アイメリアテネラ融合タンパク質免疫原及びそのマイクロ不均質又はサブユニット免疫原形態。

15. B型免疫原がSO7-CheYと称される請求項14記載の組換え体タンパク質免疫原。

16. 請求項12記載のアミノ酸配列中に含まれるアミノ酸配列を有する精製天然アイメリアテネラ免疫原タンパク質及びそのあらゆるミクロ不均質又はサブユニット形態。
17. a. タンパク質をコードするDNA分子を得、
b. DNA分子を適当な発現ベクターに挿入し、
c. 発現ベクターを適当な宿主細胞に組込み、
d. DNAを発現させタンパク質を産生させる条件下で発現ベクターを有する宿主細胞を増殖させ
e. タンパク質を回収する
ことを特徴とする請求項14記載のタンパク質免疫原の製造方法。
18. a. プロテアーゼインヒビターの存在下アイメリアテネラ胞子形成オオシストを破壊し、
b. 破壊したアイメリアテネラ胞子形成オ

12、14又は16記載のいずれかの免疫原の免疫学的有効量を包含しているアイメリアテネラ免疫原組成物。

21. A型、C型、H型又はF型の免疫原の1種以上の有効量と混合した請求項12記載の免疫原の免疫学的有効量を包含しているアイメリアテネラ免疫原組成物。
22. A型、C型、H型又はF型の免疫原の1種以上の有効量と混合した請求項16記載の免疫原の免疫学的有効量を包含しているアイメリアテネラ免疫原組成物。
23. 請求項20～22記載のいずれかの免疫原組成物の免疫学的に有効な服用量を投与することを特徴とするアイメリアテネラ誘発コクシジウム症に対して家禽を免疫する方法。
24. 請求項10～16記載のいずれかのタンパク質免疫原と反応する単一特異性抗体。
25. B型アイメリアテネラ免疫原に特異的な抗体によって同定されるB型アイメリアテネラに実質的に相当するエピトープ又は抗原決定

オシストを還元剤と接触させ、

- d. 還元した可溶化胞子形成オオシスト物質をカルボキシメチル化し、
e. サイズ排除クロマトグラフィによりタンパク質免疫原を単独で回収すること
ことを特徴とする請求項16記載のタンパク質免疫原の製造方法。
19. a. プロテアーゼインヒビターの存在下アイメリアテネラ胞子形成オオシストを破壊し、
b. 破壊したアイメリアテネラ胞子形成オオシストを還元剤と接触させ、
d. 還元した可溶化胞子形成オオシスト物質をカルボキシメチル化し、
e. イムノアフィニティクロマトグラフィによりタンパク質免疫原を単独で回収すること
ことを特徴とする請求項16記載のタンパク質免疫原の製造方法。
20. 生理学的に使用し得る媒質中請求項10、

基を包含しているアイメリア種B型タンパク質免疫原。

26. 種がE. アセルブリナ、E. ミバチ、E. ミチス、E. プレアコックス、E. ハガニ、E. ネカトリックス、E. マキシマ及びE. ブルネティイからなるアイメリア種群から選択される請求項25記載のアイメリア種B型免疫原。
27. 請求項12記載のアミノ酸配列に実質的に相当するエピトープ又は抗原決定基を包含し、E. アセルブリナ、E. ミバチ、E. ミチス、E. プレアコックス、E. ハガニ、E. ネカトリックス、E. マキシマ及びE. ブルネティイからなるアイメリア種群から選択されるアイメリアB型タンパク質免疫原及びそのミクロ不均質又はサブユニット免疫原形態。
28. 請求項27記載のB型免疫原の1種以上の免疫学的有効量を包含しているアイメリア免疫原組成物。
29. 請求項28記載の免疫原の免疫学的に有効

な服用量を投与することを特徴とするアイメリア誘発コクシジウム症に対して家禽を免疫する方法。

3. 発明の詳細な説明

コクシジウム症は、原生動物門の一分類である多数のコクシジウム種の1以上による感染によって生じる疾患である。コクシジウムは、多種の宿主に感染してヒツジ、ヤギ、ウシ、ブタ及び家禽産業に重大な経済的損害を与えうる細胞内寄生虫である。実際にも、アイメリア (*Eimeria*) 種による感染から生じるコクシジウム症は家禽産業に対して経済的に壊滅的な損害を生じさせた。家禽とは、卵又は肉源として用いられかつ商業的に重要な種類として鶏、七面鳥、アヒル、ガチョウ、ホロホロ鳥、キジ、ハト及びクジャクを含む飼育鳥として本明細書では定義される。飼育鳥の中では、鶏の生産物がコクシジウム症による経済的損害を最もうけ易いが、但し損害は七面鳥、ガチョウ、アヒル及びホロホロ鳥の場合にも発生しうる。コクシジウム症は、捕獲状態で育てられたキジ及びウズラの場合にも重大な損害を与える。コクシジウム症は急性であってかつ壊滅的な群死亡率により特徴付けられるか、又はその疾患は慢性的であ

ってかつ体重増加の欠如により特徴付けられる。

家禽は、成長期の寄生虫、即ち胞子形成嚢胞体 (oocyst) の摂取後にコクシジウムにより感染する。感染期の種虫 (sporozoite) はそれが上皮細胞中に急速に侵入した場合に放出されるが、しかる後数世代にわたる急速な細胞内無性増殖 (多数分裂) を起こし、次いで有性的分化及び交配期 (有性生殖) に入って未成熟嚢胞体を形成するが、これは糞中に排出され、しかる後細胞外胞子形成過程 (伝播生殖) に移行して成熟嚢胞体を生じる。いずれかのアイメリア種、即ち *E. acervulina*、*E. mivati*、*E. mitis*、*E. praecox*、*E. hagani*、*E. necatrix*、*E. maxima*、*E. brunetti* 及び *E. tenella* による低レベル感染の場合には、再感染に対する保護免疫を生じる。寄生虫の発育に伴い12もの多くの異なる細胞タイプが存在しうるが、各々形態学的及び抗原的に異

なる。これらの細胞タイプのうち少なくとも3種が宿主において保護免疫応答を生じることが明らかにされた (ローズ及びヘスケス、パラサイトロジー、第73巻、第25-37頁、1976年 (Rose and Hesketh, *Parasitology*, 73:25-37 (1976)) ; マクドナルド (McDonald) ら、パラサイトロジー、第93巻、第1-7頁、1986年 ; バヌシャリ及びロング、リサーチ・イン・エイビアン・コクシジオシス、プロシーディング・オブ・ザ・ジョージア・コクシジオシス・コンファレンス、アテネ、ジョージア州、USA、第526-534頁、1986年 (Bhanushali and Long, In, *Research in Avian Coccidiosis, Proceeding of the Georgia Coccidiosis Conference, Athens, GA, USA, pp.526-534(1986)*))。種虫のみならず第一及び第二世代裂虫 (schizont) のいずれもが、鶏において免疫作用を引き出す抗原を含有しているようである。

単一の優性抗原からなるプラスモジウム・ファルシバラム (*Plasmodium falciparum*) のような他

の寄生虫の種虫表面とは異なり〔サントロら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、第258巻、第3341-3345頁、1983年(Santoro et al., Journal of Biological Chemistry, 258:3341-3345(1983))〕、アイメリア種、特にE. テネラ種虫表面は抗原的に複雑なようである〔ウィッシャー、モレキュラー・アンド・バイオケミカル・パラサイトロジー、第21巻、第7-15頁、1986年(Wisher, Molecular and Biochemical Parasitology, 21:7-15(1986))〕。種虫段階では生体外で培養されず、しかも多量の線虫物質が慣用的生化学分析及びサブユニットワクチン評価のために必要であることから、これら抗原の精製が問題を提起した。本明細書で用いられているサブユニットワクチンは、いずれかのアイメリア種の生育期の1以上から単離されるか又は組換えDNA技術によって産生され、しかも単独で又は他のかかるペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質との組合せでワクチン接種後に家禽において保護免疫を生じさせるようなペプチド、

ポリペプチド又はタンパク質として定義される。組換え抗原又は免疫原は、1以上の生育期のアイメリアから単離されるペプチド、ポリペプチド又はタンパク質と同一であるか又は類似している。免疫原は、微生物に対して免疫を生じるワクチンの使用のような、体内に導入された場合に自然的な保護である免疫応答を刺激する物質として定義される。免疫は、外来生物の侵襲もしくは病原作用又は外来生物産生物の毒性作用に対する非感受性として定義される。保護免疫は、体液性又は細胞性免疫のいずれであってもよい。体液性免疫は、身体の血漿、リンパ液及び組織液中に存在しかつ細胞に付着しうる抗体によって媒介される特異的免疫として定義される。細胞性免疫は、Tリンパ球によって媒介される特異的免疫として定義される。抗原は、特異的抗体と特異的に結合しうる物質を表わすために本明細書では用いられている。

完全(インタクト)E. テネラ種虫に対して作られたモノクローナル抗体によって確認される可溶性E. テネラ種虫タンパク質は、感染性囊胞体

による侵襲から鶏を保護しうることが示された(シェンケル(Schenkel)ら、欧州特許出願第135,712号明細書)。同様の結果は、同様の技術で作られたE. テネラ娘虫(merozoite)からも得られた(シェンケルら、欧州特許出願第135,073号明細書)。免疫原ポリペプチドはE. テネラ種虫から単離された(マレー(Murray)及びガルスカ(Galuska)、米国特許第4,639,372号)。しかしながら、いずれの個別的ポリペプチドがE. テネラ侵襲から鶏を保護しているのかについて、指摘はなかった。

組換えDNA技術によれば、免疫原アイメリアポリペプチドの確認及びワクチン開発に十分な量のポリペプチドの産生が可能であった。ニューマン(Newman)らは欧州特許出願第164,176号において、それぞれ17,000及び8,000ダルトンの2つのサブユニットから構成されるE. テネラ由来の25,000ダルトンポリペプチドの単離について記載している。25,000ダルトンポリペプチドはゲノムDNAクローンを用いた組換えDNA技術によ

って産生され、E. テネラによりもたらされるコクシジウム症から鶏を保護することが示された。もう1つの免疫原E. テネラポリペプチドは、Anderson及びマクカンドリス(McCandliss)により特許協力条約出願WO第86/00528号で開示されている。このペプチドは配列決定されたが、280のアミノ酸から構成されており、囊胞体ゲノムDNAクローン及び全囊胞体mRNAから単離されるクロンの双方を用いた組換えDNA技術によって産生され、コクシジウム症から鶏を保護する。最近、クラーク(Clark)ら、モレキュラー・アンド・バイオケミカル・パラサイトロジー、第22巻、第79-87頁、1987年では、発現ベクター λ amp 3を用いた大腸菌中でのE. テネラ由来ゲノムDNA発現ライブラリーの作成について開示した。E. テネラ免疫原を発現するクロンが検出されたが、但しいずれのペプチドも免疫原活性について試験されなかった。アイメリア・テネラ種虫の表面膜は、有効な表面免疫原を特徴付けるために様々な技術

によって標識化された(ウィッシャー、モレキュラー・アンド・バイオケミカル・パラサイトロジー(Wisher, Mol. Biochem. Parasit) 第21巻、第7-15頁、1986年)。抗E. テネラ抗体と反応した主な表面ポリペプチドは、下記範囲内、即ち113-96 kD、73-67 kD、54-42 kD、37-32 kD及び18-14 kDであった。

新規B群アイメリア・テネラタンパク質免疫原についてコードする遺伝子は単離されて、新規発現ベクター中に挿入され、しかる後適切な宿主を形質転換させるために用いられた。形質転換宿主細胞は、鶏においてコクシジウム症に対する免疫を生じさせる組換えB群E. テネラタンパク質を産生する。組換えタンパク質免疫原に対して産生された抗体は、破壊されたE. テネラ孢子形成嚢胞体から天然タンパク質を単離しかつ同定するために用いられる。

したがって、本発明の目的はコクシジウム症に対して鶏を免疫するために用いることができるアイメリア・テネラの新規タンパク質を提供するこ

とである。本発明の他の目的は、孢子形成嚢胞体及び種虫に特に係わる免疫原タンパク質を提供することである。本発明のさらに他の目的は、免疫原タンパク質の推定アミノ酸配列を提供することである。本発明のさらに他の目的は、特異的タンパク質免疫原についてコードする遺伝子を単離すること及び適切な発現ベクター中に遺伝子を組込むことである。本発明のさらに他の目的は、適切な宿主を各々の組換えベクターで形質転換し、特定コクシジウム遺伝子の発現を誘導し、かつ純粋な免疫原を単離することである。本発明のさらに他の目的は、特異的コクシジウムタンパク質発現用の新規発現ベクターを製造することである。本発明のさらに他の目的は、免疫原タンパク質に対して反応する単一特異性抗体を製造することである。

本発明は、アイメリア・テネラの孢子形成嚢胞体、種虫、裂虫、娘虫に係わるタンパク質の天然もしくは組換え精製タンパク質免疫原及びいずれかの微異質(microheterogeneous)もしくはサブ

ユニット免疫原を基礎にしたコクシジウム症ワクチンに関する。本明細書で用いられている天然タンパク質とは、寄生虫の適切なアイメリア遺伝子により産生される完全な鎖長を有するタンパク質に関する。組換えとは、所望タンパク質用遺伝子の単離及び所望タンパク質を過剰産生する細菌を作り出すためのかかる精製遺伝子の使用に関する。サブユニット免疫原は、天然免疫原部分よりも少ないアミノ酸を有するが但し免疫原の免疫原性部位を含んだ免疫原タンパク質又はポリペプチド部分として定義される。本明細書で用いられる微異質体とは、翻訳後構造的に修正された単一遺伝子産物、即ちDNAの単一遺伝子ユニットから産生されるタンパク質に関する。しかしながら、これらの構造修正によって、タンパク質免疫原活性のいかなる有意的変化も生じない。修正は、寄生虫の体内で又は単離及び精製過程中に生じる。生体内修正の結果、格別限定されないが、N末端のアセチル化、タンパク質分解、グリコシル化又はホスホリル化が生じる。タンパク質分解としては、

1以上の末端アミノ酸が連続的、酵素的に開裂されて原遺伝子産物よりも少ないアミノ酸数の微異質体を生じる細胞外タンパク質分解がある。タンパク質分解には、アミノ酸配列中の特定箇所でペプチドを開裂するエンドプロテアーゼの作用によって生じる細胞内タンパク質分解修正も含む。同様の修正は精製過程中でも起こり、その結果微異質体を生じる。精製中に起きる最も一般的な修正は、プロテアーゼ阻害剤の使用によって通常最小限に保持されるタンパク質分解である。

更に本発明は、個々のタンパク質に関する遺伝情報の単離及び精製、並びに対応免疫原タンパク質の発現方法に関する。本明細書で用いられるポリペプチド又はタンパク質は、アミド結合で互いに結合したアミノ酸の直鎖ポリマーに関する。鎖中のアミノ酸配列は、タンパク質又はポリペプチドの生物学的機能に関して極めて重要である。ポリペプチド及びタンパク質は、本明細書において互換的に用いられる。本明細書で用いられる免疫原とは、動物体内に導入された場合に、天然のま

まで機能的である体液性及び／又は細胞性免疫応答、即ち特定感染症から動物を保護しうる免疫を促進する分子又は大分子に関する。本ケースにおいて、免疫原は体液性、細胞性のいずれか又は双方の免疫応答を生じさせ、コクシジウム症を起こすアイメリア種による感染から家禽を保護する。

アイメリア・テネラ嚢胞体は4～10日前、好ましくは7日前に感染した鶏の盲腸内容物から単離され、一方E. アセルブリナ嚢胞体は5～6日前に感染した鶏の糞及び腸内容物から単離される。盲腸内容物及び糞はそれぞれウエアリング・ブレンダー (Waring Blender) 内でそれぞれ蒸留水中で物理的に粉碎され、タンパク質分解酵素、好ましくはペプシンで分解される。破壊屑及びペプシンは蒸留水中での遠心により除去される。部分的に純粋な嚢胞体分画は約2.2 Mスクロース中での浮遊化により集められ (ジャクソン (Jackson)、パラサイトロジー、第54巻、第87-93頁、1964年)、更に約4℃で約10分間水中約5～約6%、好ましくは5.25%の濃度の次亜塩素

酸ナトリウム中におけるインキュベートによって処理される。次亜塩素酸ナトリウムは、精製された無菌嚢胞体を得るために、約pH7.6の無菌リン酸緩衝液 (PBS) での数回の洗浄により除去される。嚢胞体は約20℃で約48時間にわたり振盪水浴中で孢子形成せしめられる (エドガー、トランザクションズ・オブ・アメリカン・マイクロオーガニズム・ソサエティー、第62巻、第237-242頁、1954年 (Edgar, Transactions of American Microorganism Society, 62:237-242 (1954)))。

孢子形成嚢胞体はPBSに懸濁され、ブランソニック (Branson) 細胞破壊器 (ブランソン (Branson)) 中約0℃で先細プローブにより破壊される。超音波処理は加熱を防止するために約30秒間のショートバースト (short burst) で行われ、90%の破壊が約5～約20分間で生じる。界面活性剤、好ましくは約0.1 w/v %のツビッタージェント3-12 (Zwittergent 3-12) (カルビオケム (Calbiochem)) が超音波処理液に加えら

れ、混合物は約4℃で約18時間攪拌される。界面活性剤処理された孢子形成嚢胞体は約27,000 xgで約30分間遠心分離され、上澄液が集められる。

種虫は、パットン、サイエンス、第150巻、第767-769頁、1965年 (Patton, Science 150:767-769 (1965)) の操作に従い、ゆるめた乳棒装備の組織ホモゲナイザー中約4℃で約500 rpm で約5分間にわたり約pH7.6のPBS中約5 x 10⁷ /mlの精製孢子形成嚢胞体懸濁物をすりつぶすことにより得られる。E. テネラの破壊された物質は遠心分離により集められる。ペレットは非破壊嚢胞体、スポロシスト (sporocyst) 及び嚢胞体外被からなり、ハックス (Hanks) 平衡塩溶液 (pH7.4) のような緩衝液中約0.25% (w/v) トリプシン及び約4% (w/v) タウロデオキシコール酸 (シグマ (Sigma)) 含有脱囊用溶液中に再懸濁される。E. アセルブリナペレットも非破壊嚢胞体、スポロシスト及び嚢胞体外被からなり、ハックス平衡塩溶液 (pH7.4) のような緩衝

液中約0.125% (w/v) トリプシン (1:250) 及び約1.0% タウロデオキシコール酸含有脱囊用溶液中に再懸濁される。再懸濁されたペレットは約5% CO₂ 含有雰囲気中約41℃でインキュベートされる。脱囊化はE. アセルブリナの場合約0.5時間及びE. テネラの場合約1時間続けられ、しかる後溶液が遠心分離で除去される。種虫は、シュマッツら、ジャーナル・オブ・プロトゾロジー、第31巻、第181-183頁、1984年 (Schmatz et al., Journal of Protozoology 31:181-183 (1984)) の方法に従いDE-52アニオン交換カラムを用いて単離される。精製された種虫は、少なくとも3回の凍結及び解凍によって破壊されるが、破壊されるまで約1 mM フェニルメチルスルホニルフルオリド含有PBS中で超音波処理される。

孢子形成嚢胞体及び種虫細胞の双方を含有していない調製物は、pH約7.2の約50 mM Na₂HPO₄・NaH₂PO₄ 及び約0.1% ツビッタージェント3-12含有の分離用緩衝液中におけるゲル浸透クロ

マトグラフィー、好ましくはセファデックス (Sephadex) S-200 (ファルマシア (Pharmacia)) により分離される。各調製物は約 8×4.4 cm のカラムに加えられ、分離用緩衝液で溶離される。溶出は 230 nm の吸光度によってモニターされ、約 1.4 ml / 画分の画分が集められる。画分は直線勾配ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって分析され、画分はこれらの特徴に従いプールされる。プールされた画分は炭酸水素塩緩衝液に対して透析され、感染性 E. テネラ 胞子形成嚢胞体の侵襲から鶏を保護しうるそれらの能力について試験される。2 日令ブロイラー鶏は、PBS 中無胞子形成嚢胞体又は無種虫細胞免疫原タンパク質約 $5 \mu\text{g} \sim 50 \mu\text{g}$ のプール画分で筋肉内に免疫注射される。無細胞免疫原は、約 0.12 ml / 用量 / 鳥の総容量中ミョウバン (最終濃度約 0.4%) と沈降する。ミョウバン-免疫原沈降複合体は、ウェアー、実験免疫学ハンドブック、ブラックウェル・サイエンティフィック・パブリ

ケーションズ、ロンドン、第 A 3. 11 頁、1978 年 (Weir, Handbook of Experimental Immunology, Blackwell Scientific Publications, London, pg. A3. 11(1978)) の技術によって製造される。免疫処理は 9 日目及び 16 日目に繰返されたが、鳥は最終免疫後 7 日目の 23 日目に感染性 E. テネラ 胞子形成嚢胞体で侵襲される。各調製物からの単一画分が種虫侵襲から鶏を保護した。これらの画分は同様の溶出及び電気泳動特性を有していたことから、ポリペプチドが類似であることを示唆している。胞子形成嚢胞体から単離された最も活性な免疫原画分はカラム画分 84-94 でみられ、画分 V と命名されている。

抗血清は、アイメリア・テネラの胞子形成嚢胞体 (画分 V)、種虫、超音波処理非胞子形成嚢胞体、第二世代裂虫及び E. アセルブリナの超音波処理種虫の免疫保護画分に対して作られる。E. テネラ 裂虫は、ジェームス (James)、パラサイトロジー、第 80 巻、第 301-312 頁、1980 年のプロトコールに従い、感染後約 4 日間で鶏腸細

胞から得られる。血液は免疫操作開始前に抗体産生動物、好ましくはウサギから集められ、免疫前血清が単離されて、コントロール目的用に貯蔵される。ウサギは、上記のうち 1 つの免疫原タンパク質約 $20 \sim 80 \mu\text{g}$ / 免疫で複数回の免疫注射を受ける。初回の免疫は、許容されるアジュバントと共に、通常等量の免疫原及びアジュバントで行われる。許容されるアジュバントとしては、フロイント完全液、フロイント不完全液、ミョウバン沈降物、コリネバクテリウム・パルブム (*Corynebacterium parvum*) 及び tRNA 含有油中水型エマルジョンがあるが、フロイント完全アジュバントが初回免疫用として好ましい。フロイント不完全アジュバントはすべての追加免疫用として好ましい。初回免疫は、ウサギ背中の複数皮下部位におけるエマルジョン約 1 ml の投与からなる。等量の免疫原を用いる追加免疫は約 1 か月間隔で行われ、十分量の抗体が個々のウサギ血清中に存在するまで続けられる。血液は集められて、血清が当業界で公知の方法により単離される。抗

コクシジウム抗血清は、血清学的分析、好ましくは非胞子形成嚢胞体、胞子形成嚢胞体、種虫及び裂虫から得られる抗原を用いたウエスタンブロット分析によって特徴付けられる。本明細書で用いられる抗原は、抗体と結合しうるいずれかの物質として定義される。上記のような免疫原は、特異的抗体を特徴付けるために用いられる場合には抗原とみなされる。

上記のようなウエスタンブロット分析に用いられる約 $50 \mu\text{g}$ の寄生虫免疫原は、約 pH 6.8 の約 0.1 M トリス HCl、約 4% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、約 20% (v/v) グリセロール、約 10% (v/v) 2-メルカプトエタノール及び約 0.002% (v/v) ブロモフェノールブルーからなる約 2 倍濃縮サンプル緩衝液とほぼ等量で混合される。サンプルは、レムリ、ネーチャー、第 227 巻、第 680-684 頁、1970 年 (Laemmli, Nature 227:680-684(1970)) の方法により、約 3 分間煮沸され、SDS 含有ポリアクリルアミドゲル (PAGE) の $5 \sim 20\%$ 直線勾配上で電気泳

動に付される。SDS-PAGEにより分離されたタンパク質はトービンら、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンスUSA、第76巻、第4350-4354頁、1979年〔Towbin et al., Proceeding of National Academy of Science USA 76:4350-4354 (1979)〕の方法により電気泳動的にニトロセルロースに移動し、ニトロセルロースは約pH7.4のリン酸緩衝液中0.5%ゼラチンでブロックされる。ブロックされたニトロセルロースは、約0.25%ゼラチン及び0.05%トリトンX-100含有TEN緩衝液(約pH7.4の約50mMトリス-HCl、約150mM NaCl及び約5mMエチレンジアミン四酢酸(EDTA))中約1:5~1:400で希釈された適切な抗血清約20mL中において室温で一夜インキュベートされる。結合抗体は¹²⁵I-タンパク質Aの添加によって検出される。

免疫を生じる上記コクシジウムポリペプチドのいずれもが公知の分離又は精製法によって均質に精製されえないことから、個々のポリペプチドの

アミノ酸組成を明らかにすることは不可能であった。したがって、様々なアイメリア抗原に対する抗体が、組換えDNA技術で得られる保護コクシジウム免疫原ポリペプチドを免疫学的方法により確認するために用いられる。組換えDNA技術は、異なる細胞、通常異なる生物由来の遺伝情報DNAセグメントをそのDNAが得られる生物体外で端部間で結合させかつ原DNAがコードするタンパク質について産生すべき細胞中にこのハイブリッドDNAを組み込むための技術として、本明細書では定義される。遺伝情報DNA又はmRNAは胞子形成嚢胞体又は種虫から単離され、適切なクローニングベクターに組み込まれ、適切な宿主細胞中に導入されて、宿主細胞の産物は抗E. テネラ抗体と結合するポリペプチドの産生に関してスクリーニングされる。免疫反応性ポリペプチドを発現することが確認された遺伝子は、適切な発現ベクター中に組み込まれ、適切な宿主細胞系中で発現せしめられる。

本明細書で用いられるクローニングベクターは、

特定の実験的外来DNAの組み込みが可能であって、しかも安定状態で存在しかつ実験的DNAで指示されたタンパク質を発現しうる宿主細胞中に結合DNAが導入されるためのDNA配列として定義される。ベクターDNAと結合した外来DNAは、組換え技術で得られる組換えDNA分子を構成する。クローニングベクターとしては、プラスミド、バクテリオファージ、ウイルス及びコスミドがある。いずれのクローニングベクターも新規アイメリア免疫原DNA配列を複製するために使用可能であると解されるが、ラムダgt11が好ましい。通常、クローニング、DNAプロセッシング及び初期発現用の宿主細胞としては細菌がある。好ましいクローニング用宿主は大腸菌である。発現ベクターは、適切な宿主中における遺伝子複製コピーの転写及びそれらmRNAの翻訳のために必要なDNA配列として本明細書では定義される。このようなベクターは、細菌、藍藻植物、酵母細胞、昆虫細胞及び動物細胞のような様々な宿主中で原核細胞又は真核細胞いずれかの遺伝子を発現させ

るために使用することができる。免疫原は、いくつかのウイルス系中でも発現しうる。特別にデザインされたベクターは、細菌-酵母又は細菌-動物細胞間におけるDNAのシャトル化(shuttling)を可能にする。適切に構成された発現ベクターは、宿主細胞中での自律的複製用の複製源、選択マーカー、限定数の有用な制限酵素部位、高コピー数及び強いプロモーターを含んでいるべきである。プロモーターは、RNAポリメラーゼをDNAに結合させてRNA合成を開始させるためのDNA配列として定義される。強プロモーターとは、高頻度でmRNAが開始せしめられるようなものをいう。発現ベクターとしては、格別限定されないが、クローニングベクター、修正クローニングベクター、特別デザインプラスミド又はウイルスがある。

本発明の独特な免疫原タンパク質は、格別限定されないが、アイメリアの規定遺伝子により特定化される完全タンパク質、即ち天然タンパク質として又はそのいずれかのフラグメントもしくはサ

ブユニットとして、又は完全タンパク質、そのフラグメントもしくはサブユニットのハイブリッドとして存在しうる。本明細書で用いられる完全タンパク質とは、適切なアイメリア遺伝子から得られる完全鎖長ポリペプチドに関する。完全タンパク質は、適切なアイメリア種からの精製により、又は対応組換え遺伝子産物の適切な発現ベクターにおける発現により得られる。タンパク質フラグメント又はサブユニットとは、完全タンパク質よりも少ないアミノ酸数であってかつ抗コクシジウム免疫を導きうる能力を留めたいずれかのタンパク質部分に関する。ハイブリッドタンパク質としては、格別限定されないが、発現ベクター内の複数遺伝子の発現から得られるタンパク質又は融合タンパク質がある。融合タンパク質は、発現ベクターによりコードされた限定数のアミノ酸が発現せしめられて、発現の結果特異的免疫原ポリペプチドにそれらが結合しているようなものとして定義される。複数遺伝子から得られるタンパク質としては、免疫反応性を高める第二ポリペプチド又

はペプチドにペプチド結合で結合せしめられた特異的免疫原ポリペプチドがある。高めるポリペプチド部分は、コクシジウム免疫原に対する免疫応答性を増加させうる能力を有している。

適切なコクシジウムDNAは、遺伝子由来タンパク質を抗原分V及び抗種虫抗体と反応させることにより単離かつ確認される。組換えコクシジウムポリペプチドは、ゲノムDNA又はcDNAいずれかの天然遺伝子をクローニングすることにより得られる。ゲノムDNAは、特異的遺伝子を得る好ましい方法であるが、約0.5% SDS及び約15mM EDTAによる処理で約 1.5×10^8 の寄生虫を破壊することによりスポロシスト又は種虫から抽出される。放出されたDNAは、約50℃で約3時間約 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のタンパク質分解酵素、好ましくはプロテイナーゼKでの分解によって可溶化される。ゲノムDNAは、フェノールによる約2回の抽出、フェノール、クロロホルム及びイソアミルアルコール(約25:24:1)の混合物による約2回の抽出、クロロホルム及び

イソアミルアルコール(約24:1)による約2回の抽出、並びに酢酸ナトリウム/エタノールによる約2回の連続的沈降によって精製される。DNAは、約70%エタノールで2回洗浄され、約 5×10^8 寄生虫相当数/ ml のおよその濃度でトリスHCl、約10mM、EDTA、約1mM (TE)中に再懸濁される。いずれの関連RNAも、約37℃で約60分間約 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でRNAアーゼ、好ましくは熱不活性化RNAアーゼAでの分解により選択的に除去される。RNAアーゼA及び他のいずれの残留タンパク質も、約50℃で約3時間約0.5% SDS/15mM EDTA中におけるプロテイナーゼKによる二次分解によって除去される。次いで、ゲノムDNAは有機溶媒で抽出され、エタノールで沈降され、約70%エタノールで洗浄され、遠心分離により集められる。ゲノムDNAペレットは約 $2 \sim 3 \times 10^8$ 種虫相当数/ ml の濃度でTEに懸濁され、260nmでの吸光度により定量される。コクシジウムDNAは、高分子量DNAの物理的(オールド及びブライム

ローズ、遺伝子操作の原理、第2版、カリフォルニア大学出版、第20頁、1981年(Old and Primrose, Principles of Gene Manipulation, 2nd Ed., University of California Press, p.20 (1981))又は化学的(スミシーズ(Smithies)ら、サイエンス、第202巻、第1284-1289頁、1978年)いずれかの断片化によってクローニング用に製造される。次いで、ゲノムDNAは適切なクローニングベクター、即ち下記cDNA用クローニングベクター中に組込まれる。クローニングベクターは宿主細胞中に導入され、ヒューインら、"DNAクローニング:実務的アプローチ"、第1巻、グローバー編集、IRLプレス、オックスフォード、第49-78頁、1985年(Huynh et al., In "DNA cloning: A practical approach", Vol. I, Glover Ed., IRL Press, Oxford, pp. 49-78(1985))の場合と同様の操作によってスクリーニングされる。陽性クローンは、所望の免疫原タンパク質の多量産生用に工学処理された発現ベクターに移される。下記発現ベクタ

ーは、免疫原タンパク質産生用に適した下記宿主細胞中に導入されて形質転換させる。

コクシジウム免疫原ポリペプチド産生用の遺伝情報を得るための最も好ましい方法は、特定タンパク質についてコードするmRNAの単離である。全RNAは、約7時間胞子形成された嚢胞体及び種虫からチャークウィンら、バイオケミストリー、第18巻、第5294-5299頁、1979年〔Chirgwin et al., Biochemistry 18:5294-5299 (1979)〕のグアニジニウムチオシアネート法を用いて単離される。ポリアデニル化RNAは、オリゴ(dT)-セルロースクロマトグラフィーにより選択される〔アビブ(Aviv)及びレーダー(Leder)、ピロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンスUSA (Aviv and Leder, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69、第69巻、第1408-1412頁、1972年)〕。約6~約9 μ gのポリアデニル化RNAを用いる場合、一次及び二次cDNA鎖反応はガブラー及びホフマン、ジーン、第25巻、第263-

269頁、1983年〔Gubler and Hoffman, Gene 25:263-269 (1983)〕に記載された操作に従い、AMVリバーシトランスクリプターゼのようなリバーシトランスクリプターゼ、RNアーゼHのようなRNアーゼ及びDNAポリメラーゼIのようなDNAポリメラーゼを用いて行われる。cDNAはEcoRIメチラーゼのようなメチラーゼでメチル化され、T4DNAポリメラーゼのようなポリメラーゼでプラント末端化され、T4DNAリガーゼのようなDNAリガーゼによってEcoRIデキサヌクレオチドリンカーのようなホスホリル化オリゴヌクレオチドリンカーに結合せしめられる。リンカー結合cDNAはEcoRIのような制限酵素で完全に切断され、切断されたリンカーは2M酢酸アンモニウムから無水エタノールによる繰返し沈降によって除去される〔オカヤマ及びバーク、モレキュラー・セル・バイオロジー、第2巻、第161-170頁、1982年〔Okayama and Berg, Molecular Cell Biology 2:161-170 (1982)〕〕。cDNAはエルチップー

(Elutip-d) カラム〔シュライヒャー&シュル(Schleicher & Schell)〕で更に精製される。制限酵素又は制限エンドヌクレアーゼとは、二本鎖DNA中の特定ヌクレオチド塩基配列を認識しかつ認識配列中の特定位置において2本の鎖を開裂する酵素である。約100~約500ng、好ましくは300ngの精製cDNAは、約7.5 μ gの市販EcoRI切断アルカリホスファターゼ処理rgt11ベクターDNA中に結合せしめられ、製造者の指示〔アマーシャム(Amersham)〕に従い市販パッケージ化抽出物により生体外でパッケージ化される。他の許容されるベクターも使用可能であるが、rgt11が好ましく、その理由はそれが大腸菌中で β -ガラクトシダーゼ融合タンパク質としてアイメリア抗原の発現を誘導しうるからである。パッケージ化ファージの一部は大腸菌宿主Y1088株に導入され、これらは約600 μ g/ml X-gal (5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド)及び約16mMイソプロピル- β -D-チオガラクトピラ

ノシド(IPTG)含有LB軟質寒天約2.5mlを用いてルリアーバークニ(Luria-Bertani)(LB)培地寒天プレート上におかれる。

約 1×10^7 の独立組換えファージクローンからなるcDNAライブラリーが得られる。非組換えバックグラウンドは、X-gal/IPTGプレート上での増殖性から決定した場合、約13%であると評価される。

cDNAライブラリーのスクリーニングは、ヒューインら、"DNAクローニング：実務的アプローチ"、第1巻、グローバー編集、IRLプレス、オックスフォード、第49-78頁、1985年の方法によって行われる。非増幅cDNAライブラリーからパッケージ化されたファージは上記ヒューイン記載の大腸菌Y1090株中に導入され、約0.5~約 1.0×10^5 プラーク形成単位(pfu)/プレートの適切な密度でプレート培養される。プレートは約42℃で約3時間インキュベートされ、約10mM IPTG中に予め浸漬されたニトロセルロースフィルターで覆われ、約37℃で-

夜再インキュベートされる。フィルターは除去され、約0.05%ツイーン (Tween) 20 (TBS-T) 含有トリス緩衝液 (TBS) (約50mMトリスHCl、約150mM NaCl、pH約8.0) のような許容される緩衝液中約20%牛胎児血清でブロックされ、約20%牛胎児血清含有TBS-T中約1:100希釈された適切な抗体、通常ウサギ抗種虫抗体又はウサギ抗画分V抗体と共に適切な時間にわたりインキュベートされる。すべての抗血清はラムgt11溶原BNN93の濃溶離物で完全に事前吸着される。抗体結合部位は、フィルターをβ-タンパク質Aと接触させることにより検出される。陽性ブランクは、各クローンが純粋ブランクであることが示されるまで、取出され、再プレート培養されかつ再スクリーニングされる。ウサギ抗種虫抗体による約 1×10^4 独立組換え体の孢子形成囊胞体ライブラリーの初回スクリーニングでは、約57の抗原発現ファージが単離される。二次及び三次の再スクリーニングでは、初回に確認されたクローンの29%以上が陽性のまま

シダーゼ融合タンパク質の合成が約10mM IPTGの培地添加によって誘導される。細胞はインキュベートされ、遠心分離により集められ、ペレットがpH約7.5の約50mMトリスHCl、約150mM NaCl、約5mMエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 含有NET緩衝液約250μl中約2%SDSと共に再懸濁される。細胞は煮沸により溶離され、細菌DNAが遠心分離により除去される。上澄液は変性条件下で約5%SDS-PAGE上において分析される。2つの同一ゲルが用いられるが、1つは銀染料 (バイオラッド (Biorad)) で染色され、他はトーピンら、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス USA、第76巻、第4350-4354頁、1979年の方法によって免疫プロットされる。

組換え免疫原の各々に対する単一特異性抗体は、ホール (Hall) ら、ネーチャー、第311巻、第379-382頁、1984年の方法の修正法により多特異性 (polyspecific) 抗血清からアフィニティー精製されるか、前記のようないサギを下

であることを示す。

交差スクリーニングでは、前記のように誘導された組換え融合タンパク質と共に大腸菌Y1090細胞の区画上に各ブランク精製クロンのファージ溶離物約1μlをスポットすることが必要である。タンパク質はニトロセルロースに移動し、上記のように免疫プロットされる。交差スクリーニング用抗血清としては、ウサギ抗E. テネラ非孢子形成囊胞体抗体、ウサギ抗E. テネラ種虫抗体、ウサギ抗画分V及びウサギ抗E. テネラ裂虫抗体がある。すべての抗血清はgt11溶原BNN93の濃溶離物で完全に事前吸着される。

組換え体及び野性型gt11ファージは、約10の多重度で大腸菌宿主Y1089株中に溶原として導入される。溶原化クロンは、約50μg/mlアンピシリン補充ルリアーバタン (LB) 培地約10ml中約32℃で、600nmの光学密度が0.25に達するまで増殖せしめられる。ファージ複製は約20分間にわたる約45℃への温度シフトによって誘導され、β-ガラクト

記のような精製組換えE. テネラタンパク質で免疫処理することにより得られるか、又はコーラー (Kohler) 及びミルスタイン (Milstein)、ネーチャー、第256巻、第495-497頁、1975年の技術を用いてモノクローナル抗体として得られる。本明細書で用いられる単一特異性抗体は、関連抗原との均質的結合特性がある単一抗体種又は多抗体種として定義される。本明細書で用いられる均質的結合とは、特異的な天然又は組換えE. テネラ群免疫原と関連した特異的抗原又はエピトープと結合しうる抗体種の能力に関する。ポリクローナル抗血清から単一特異性抗体を得るホルの技術では、スクリーニング用に必要とされる精製組換えクロンからのフィルターブランクリフト (lift) の製造を必要とする。約 2×10^5 のブランク形成単位が、37℃のインキュベーション時間の最後で半融合溶菌状態に近づくようにプレート培養される。ニトロセルロースはプレートから取除かれ、TBS-T中で約4時間約20%牛胎児血清でブロックされ、約0.02% NaN_3 含有

T B S T 中約 20% 牛胎児血清で約 1 : 200 希釈された事前吸着多特異性血清約 20 ml と共に一夜インキュベートされる。フィルターは、少なくとも 20 分間約 50 ml T B S T で少なくとも 5 回並びに約 0.15 M NaCl 及び 0.05% ツイーン 20 で 1 回洗浄される。抗体は、pH 約 2.8 で約 30 分間約 0.2 M グリシン-HCl、約 0.15 M NaCl 及び約 0.05% ツイーン 20 のような許容される溶離剤で溶離される。pH は約 8.0 に調節され、抗体は貯蔵される。

組換え E. テネラ群免疫原、抗原又はエピトープの各々に対して反応性のモノクローナル抗体は、近交系マウス、好ましくは BaLb/c を適切な組換えタンパク質で免疫処理することにより得られる。マウスは、等量の許容しうるアジュバント中 0.5 ml につき約 100 ng ~ 約 10 µg、好ましくは約 1 µg の組換え免疫原で腹腔内に免疫注射される。このような許容しうるアジュバントとしては、格別限定されないが、フロイント完全液、フロイント不完全液、ミョウバン沈降物、コリネ

バクテリウム・バルブム及び tRNA 含有油中水型エマルジョンがある。マウスには、初回免疫後約 14、21 及び 63 日目にアジュバントなしで等量の組換え免疫原の静注追加免疫が行われる。最終追加免疫後約 3 日目に、個々のマウスは抗組換え免疫原抗体に関して血清学的に試験される。抗体産生マウスから脾臓細胞が単離され、当業界で公知の技術により SP-2/0 等のようなマウスミエローマ細胞と融合せしめられる（コーラー及びミルスタイン、ネーチャー、第 256 巻、第 495-497 頁、1975 年参照）。ハイブリドーマ細胞はダルベッコ修正イーグル培地 (DMEM) のような適切な細胞培地中ヒポキサンチン、チミジン及びアミノプテリン存在下での増殖により選択される。抗体産生ハイブリドーマは、好ましくはマクファーンソン、軟寒天技術、組織培養法及び応用、クルーズ及びバクターソン編集、アカデミックプレス、第 276 頁、1973 年 (MacPherson, Soft Agar Techniques, in Tissue Culture Method and Applications, Kruse and Paterson, Eds.

Academic Press, p. 276(1973)) の軟寒天技術を用いてクローニングされる。別々のコロニーが適切な培地中での培養用に培養プレートの各ウェルに移される。抗体産生細胞は、適切な E. テネラ組換え免疫原でスクリーニングすることにより確認される。免疫原陽性ハイブリドーマ細胞は、当業界で公知の技術により維持される。特異的抗組換え E. テネラモノクローナル抗体は、生体外でハイブリドーマを培養するか又は当業界で公知の操作によりハイブリドーマ注射後マウス体内で腹水を作り出すことにより得られる。

寄生虫抗原は、前記ウェスタンブロット分析により分析される。対象クローンは、発現ポリペプチドと上記抗血清との反応性に応じて 4 つの抗原群に分けられる (第 1 表参照)。同一群の異なるクローンは、下記のように、抗体反応性、DNA 交差ハイブリッド形成及び制限エンドヌクレアーゼ地図作成から判断した場合に、同一ポリペプチドの各部分を発現する。

第 1 表

単離クローン産物の免疫反応性

クローン	抗原分 V	抗 E. t. 非細胞形成 細胞体	抗 E. t. 種虫	抗 E. t. 裂虫	抗 E. a. 種虫
A	+	+	+	-	+
B	+	-	+	-	+
C	+	-	+	-	-
H	+	-	+	n.d.	-
F	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

E. t. はアイメリア・テネラを示し、一方 E. a. はアイメリア・アセルブリナを示す。(+) は抗体が特異的組換え誘導タンパク質と反応することを示し、一方 (-) はかかる応答性の欠如を示し、n.d. は実施せず (not done) を意味する。

rgt11 クローンからの cDNA インサート (insert) の精製は、約 pH 7.5 の約 50 mM NaCl / 約 100 mM トリス HCl、約 5 mM MgCl₂ からなる反応緩衝液中約 5 倍過剰の酵素 EcoRI で組換えファージ DNA を完全に切断することにより

行われる。反応生成物は約1/10量の3M(pH 5.6)貯蔵溶液の添加によって約0.3M酢酸ナトリウムに調製され、エタノールで沈降され、冷却され、遠心分離によって集められる。ペレットをTEに懸濁後、DNAは臭化エチジウム含有アガロース中で電気泳動に付され、フェージアーム(arm)からインサートを分離させる。

インサートの分別化は、紫外線下での視覚化により確かめられる。インサートはNA-45(シュレーチャー&シュエル)膜上で電気泳動に付され、かかる後膜から溶離される。不溶性粒子は遠心分離により除去され、可溶性物質はフェノール、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール及びクロロホルム/イソアミルアルコールで抽出される。DNAは酢酸ナトリウム/エタノールで沈降され、エタノールで洗浄され、風乾される。各DNAの一部が確認用分析アガロースゲル上で分析される。

保護コクシジウム免疫原についてコードする遺伝子の発現は、様々なプロモーター発現系をもつ

いくつかの異なる宿主細胞中で行われる。宿主細胞としては、細菌、酵母、昆虫及び哺乳動物細胞がある。抗原はいくつかのウイルス系でも発現可能である。遺伝子は多数の原核生物細胞及び様々な真核生物細胞中で発現しうるが、最も好ましい宿主細胞は大腸菌である。保護免疫原の発現用に使用可能な発現ベクターとしては格別限定されず、pBR322、pPLa2311、pKC30、ptac12、 λ gt11、pAS1、pLC24、pSB226、pRIT2T及びSV40があるが、pJC264と命名されたCheY-pUC由来ベクターが好ましい。天然タンパク質もしくはそのフラグメント、組換えタンパク質もしくはそのフラグメント又はアイメリアペプチド免疫原性を高めるかもしくは高めない他のタンパク質と結合した融合タンパク質であるアイメリア・テネラ免疫原の使用が本発明に含まれることは望ましいしかつその意図でもある。融合免疫原は、免疫原発現タンパク質が発現プラスミドでコードされた付加ポリペプチド部分又は付加DNA塩基配列の

導入によって遺伝子に加えられた付加ペプチド部分を含有するようにデザインされる。pJC264プラスミドは、様々なアイメリア・テネラペプチドに結合又は融合した5つのリンカーアミノ酸に機能可能に結合せしめられた大腸菌CheYタンパク質の88アミノ酸部分の発現を含むようにデザインされる。機能可能に結合せしめられたとは、所望のタンパク質が機能可能に結合した遺伝子、セグメント又はリンカーをもつ発現ベクターを含んだ細胞によって産生されうるようなヌクレオチドセグメント、リンカー又は遺伝子の適切な連続的配列を意味する。CheY遺伝子のヌクレオチド配列及びその遺伝子から得られるアミノ酸配列は下記表で示されている。

第2表

CheYタンパク質のアミノ酸及びヌクレオチド配列

10	20	30	40	50	
*	*	*	*	*	
ATG GCG GAT AAA GAA CTT AAA TTT TTG GTT GTG GAT GAC TTT TCC ACC ATG CGA					
MET ALA ASP LYS GLU LEU LYS PHE LEU VAL VAL ASP ASP PHE SER THR MET ARG					
10					
60	70	80	90	100	
*	*	*	*	*	
CGC ATA GTG CGT AAC CTG CTG AAA GAG CTG GGA TTC AAT AAT GTT GAG GAA GCG					
ARG ILE VAL ARG ASN LEU LEU LYS GLU LEU GLY PHE ASN ASN VAL GLU GLU ALA					
20	30				
110	120	130	140	150	160
*	*	*	*	*	*
GAA GAT GGC GTC GAC GCT CTC AAT AAG TTG CAG GCA GGC GGT TAT GGA TTT GTT					
GLU ASP GLY VAL ASP ALA LEU ASN LYS LEU GLN ALA GLY GLY TYR GLY PHE VAL					
40	50				

第2表 (続き)

CheYタンパク質のアミノ酸及びヌクレオチド配列

170	180	190	200	210
*	*	*	*	*
ATC TCC GAC TGG AAC ATG CCC AAC ATG GAT GGC CTG GAA TTG CTG AAA ACA ATT				
ILE SER ASP TRP ASN MET PRO ASN MET ASP GLY LEU GLU LEU LEU LYS THR ILE				
60			70	
220	230	240	250	260
*	*	*	*	*
CGT GCG GAT GGC GCG ATG TCG GCA TTG CCA GTG TTA ATG GTG ACT GCA				
ARG ALA ASP GLY ALA MET SER ALA LEU PRO VAL LEU MET VAL THR ALA				
80				

リンカーアミノ酸は、天然タンパク質を産生する前記のE. テネラ遺伝子を融合タンパク質に結合させるために用いられるアミノ酸として本明細書では定義される。いずれのアミノ酸又はアミノ酸群もリンカーとして使用可能であるが、しかしな

及びCheZ遺伝子を含むCheオペロンフラグメントはBamHI-HindIIIフラグメントとしてpLC1-28プラスミドから取出され、BamHI-HindIII切断pUC13プラスミド(PLバイオケミカルズ(PL Biochemicals))に組込まれてサブクローニングされ、pUC13-CheY-CheZプラスミドを生じる。pUC13-CheY-CheZで形質転換された大腸菌JM105クローンは、pUC13ベクターの影響をうけるlacプロモーターを除き、CheY及びCheZポリペプチドを発現する(デービスら、分子生物学における基本的方法、エルスビア、ニューヨーク、ニューヨーク、第30頁、1986年(Davis et al., Basic Methods In Molecular Biology, Elsevier, New York, New York, pg. 30 (1986)))。pUC13-CheY-CheZプラスミドは、CheYコード領域内部の唯一のPstI部位(前記マツモトら参照)及び挿入CheDNAの3'側のpUC13ポリリンカー内の唯一のSmaI部位で切断される。pUC13ベクター及びCheYのN末端100残

がらCheYタンパク質をE. テネラタンパク質に結合しうるタンパク質の好ましいアミノ酸配列及びヌクレオチド配列は以下のとおりである:

5' GCC CAA GAA TTC GCN 3'
ALA GLN GLU PHE GLY

3'末端NはcDNAの第一ヌクレオチドを構成し、得られるアミノ酸がいつもグリシンであればいずれのヌクレオチドも表わす。

好ましいプラスミドpJC264はプラスミドpJC220から得られるが、これは大腸菌走化性遺伝子CheY及びラット動脈性ナトリウム利尿ファクター(ANF)の遺伝子の部分を含んだ構造体から得られる。CheY-ANFプラスミドは、マツムラら、ジャーナル・オブ・バクテリオロジー、第160巻、第36-41頁、1984年(Matsumura et al., Journal of Bacteriology 160:36-41 (1984))に記載されたCoLE1由来プラスミドpLC1-28から作成される。CheY

基についてコードするDNAを含んだ、得られる3kbPstI-SmaIフラグメントは、Met-(ラットANF-26)配列についてコードしかつANFペプチドの末端コドンの3'側に非翻訳RAS1配列50bpを有するpSCN1-(ラットANF-26)の160bpPstI-HindIIIフラグメントと再結合される。この発現ベクターはCheY-ANFベクターと呼ばれる。pSCN1-(ラットANF-26)融合プラスミドは、酵母RAS1タンパク質SC1NのN末端165アミノ酸を発現するpSCN1プラスミドから作成される(テミール(Temele)ら、ネーチャー、第313巻、第700-703頁、1985年)。プラスミドpSC1NはAccIで完全に分解され、末端は大腸菌DNAポリメラーゼI大フラグメント(クレノウポリメラーゼ)で補足される。合成ANF遺伝子はpSC1Nに結合されて、コンピテント(competent)大腸菌JM105細胞を形質転換させるために用いられる。CheYフラグメントの前のEcoRI制限部位から最初のHindIII制

限部位までのCheY-A N Fプラスミドのヌクレオチド配列は、ヤニッシューペロン (Yanisch-Perron) ら、ジーン、第33巻、第103-119頁、1985年でpUC19に関して示されたものと同一である。

p J C 2 6 4 発現プラスミドは λ gt11 EcoRI部位として同一の読取り枠で唯一のEcoRI部位を有しており、 λ gt11発現ライブラリーからのEcoRIフラグメントの容易なサブクローニング及び発現を可能にしている。得られる融合タンパク質中におけるCheY遺伝子産物部分の取込みは、タンパク質の安定化を促進しかつタンパク質の精製度を高める。 β -ガラクトシダーゼのような他の融合キャリアと比較してサイズの小さなCheYタンパク質の場合には、所定質量の融合タンパク質において対象タンパク質のモル収率をより好ましいものにする。CheY含有プラスミドp J C 2 6 4は、アミノ末端の最初の93アミノ酸が大腸菌CheYタンパク質及びリンカーに由来する融合タンパク質を高レベルで発現する。上記のよう

末端にHindIII部位を有しており、したがって独特である。プラスミドp J C 2 2 0はHindIIIで切断され、4塩基突出部(overhang)のうち2塩基はdATP及びdGTPの存在下DNAポリメラーゼIのクレノウフラグメントで補足される。突出部のうち残り2塩基はS1又はクレアーゼで除去され、ブラント末端を与える。次いで、DNAはEcoRIで切断され、dATP及びdTTPの存在下DNAポリメラーゼIのクレノウフラグメントで補足される。プラスミドはT4DNAリガーゼによるブラント末端結合で再環化されてp J C 2 6 4を生じるが、これはCheYコード領域の3'末端側に唯一のEcoRI部位を有している。今度のEcoRI部位は λ gt11のEcoRI部位として同一の読取り枠内に存在するため、 λ gt11ライブラリー中発現により確認される抗原のCheY融合タンパク質として直接的サブクローニング及び発現が可能になる。p J C 2 6 4制限地図は第8図で示されている。

組換え λ gt11バクテリオファージのミニプレ

に、p J C 2 6 4プラスミドは第7図で示されているようにCheY-A N Fプラスミドから得られる。CheY-A N FはHindIIIで部分的に切断され、約0.7%シーブラーク (Seaplaque) アガロースゲル中で電気泳動に付される。完全鎖長直鎖DNAは機械的に摘出され、溶融によりゲルから除かれ、NACSカラム (BRL) で精製され、エタノール沈降により回収される。DNAフラグメントはDNAポリメラーゼIのクレノウフラグメント (ベーリンガー・マンハイム (Boehringer Mannheim)) でHindIII末端を補足することによりブラント化され、フェノール抽出され、エタノール沈降に供される。5'位でホスホリル化されたBamHIリンカーは精製DNAに結合され、大腸菌HB101は結合混合体で直接形質転換される。アンピシリン耐性形質転換体コロニーはBamHIリンカー用に制限地図化される。p J C 2 2 0と命名されたコロニーはプロモーター隣接HindIII部位にBamHIリンカーを有している。プラスミドはその場合にCheYコード領域の3'

ブ (miniprep) が製造され、ファージDNAが単離される。各抗原用の遺伝子インサートはEcoRI消化で除去され、アガロースゲル電気泳動によりファージームから分別化される。次いで遺伝子は、唯一のEcoRI部位で直鎖化されかつホスファターゼ処理されて自律結合能を低下させたプラスミドp J C 2 6 4中に挿入される。次いで、結合生成物は当業界で公知の標準的CaCl₂法を用いて細菌宿主大腸菌JM83中に組込まれて形質感染され (transfect)、形質転換体はアンピシリンプレート上で選択される。アンピシリン耐性コロニーは、E. テネラ免疫原に対して得られるポリクローナル抗血清を用いて、インサートの存在について調べ、細菌プロモーターに関する外来DNAの向きについて調べ、かつウェスタンブロット分析により細菌融合タンパク質の発現について調べるために、分析的スケールで増殖せしめられる。

DNAインサートは上記で確認された様々な免疫原群の代表的ファージクローンから単離され、

かつCheYベクターpJC264に関して前記されたpUC18プラスミドベクターに組込まれてサブクローニングされる。各群の構成物の制限エンドヌクレアーゼ地図が作成される。制限エンドヌクレアーゼとしては、格別限定されず、下記のものがある：

AluI	Hind III	Sall
Apal	Hinc II	Sau3a
AvaI	HinfI	SstI
Ava II	Hpa II	Sst II
BamHI	KpnI	TaqI
BglI	NcoI	XbaI
ClaI	PstI	XhoI
Hae III	PvuI	Xho II
HhaI	Pvu II	

上記のすべてが市販されている。下記表は、群、各群に属するクローンの名称及びクローンインサート内で切断不可能な制限エンドヌクレアーゼに

ついて示している。

第3表

命名されたクローンに存在しない

制限エンドヌクレアーゼ部位

群	クローン名称	制限エンドヌクレアーゼ
A	S06'	BamHI, Hind III, KpnI, NcoI,
	SP1	AvaI, ClaI, XhoI, Sall,
	S067	SstI, Sst II, XbaI, BglI,
B	S09	BamHI, Hinc II, KpnI,
	S024	NcoI, ClaI, Sall, SstI,
	S07'	XbaI
	S01'	
C	SP54	BamHI, KpnI, Hinc II,
	SP59	NcoI, ClaI, Pvu II, XhoI, Sall, SstI, Sst II, XbaI, BglI

第3表 (続き)

群	クローン名称	制限エンドヌクレアーゼ
H	S0311	BamHI, Hind III, KpnI,
	S0227	Ava II, Apal, NcoI,
	S0231	AvaI, ClaI, PstI, XhoI, Sall, Sst II, XbaI
F	S0216	Apal, AvaI, Ava II, BamHI, BglI, ClaI, Hinc II, NcoI, PstI, Pvu II, Sall, SstI, Sst II, XbaI, XhoI

一部の制限エンドヌクレアーゼは、すべてのクローンではないが、群中の1以上のクローンを開裂することができる。B群において、4つのクローンのうち少なくとも1つを開裂する他の制限エンドヌクレアーゼとしてはAvaI、PstI、Sst IIがある。これらの部位は地図に示されなかった。H群において、制限エンドヌクレアーゼSstIは3つのクローンすべてを開裂しないが、但しその

部位は地図にまだ示されていない。

上記情報は、LBブイヨン中ミニ調製物としてpUC18組換えプラスミドを増殖させかつ下記アルカリ溶菌法を用いてDNAを単離することにより決定される。DNAは約20 μ g/ μ l DNアーゼフリー臍臓RNアーゼ含有約10 mMトリス-HCl (約pH 8.0)、約1 mM EDTA (約pH 8.0) を含有したTE緩衝液のような分解用緩衝液中に再懸濁され、ボルテックス (Vortex渦巻式) ミキサーで簡単に混合される。次いで、DNAサンプルはcDNAインサートを開裂しうる能力をもつか否かを決定するために様々な制限エンドヌクレアーゼ (ベセスダ・リサーチ・ラボラトリーズ (Bethesda Research Laboratories) 市販) で分解される。地図作成分析は、インサート/プラスミドの単一及び二重分解をするために行われる。DNAフラグメントは約1%アガロースゲル上で電気泳動分離され、同一ゲルで同時に操作されたDNAマーカーと比較してサイズ分けされる。地図は、フラグメントサイズデータ及び公知のベク

ター制限部位をインテリジェネティクス制限地図作成プログラム (Intelligenetics Restriction Map Generator program) (MAP、インテリジェネティクス社 (Intelligenetics, Inc.)) に加えることによって各クローンから作成される。ヌクレオチド配列に沿って導かれる酵素切断部位の位置は約±10%のレベルで正確である。A群の制限地図は第1図に示されている。SO6遺伝子は、下記塩基位置に制限部位を有する鎖長約1886のヌクレオチド(nt)である: 118 (Apa I)、284 (Pst I)、293 (Pvu II)、597 (Pst I)、1283 (Pst I)、1820 (Hinc II) 及び1837 (Ava II)。SP1遺伝子は下記塩基位置に制限部位を有する約1404 ntである: 213 (Pst I)、889 (Pst I)、1386 (Hinc II) 及び1398 (Ava II)。SO67遺伝子は下記塩基位置に制限部位を有する鎖長822 ntである: 108 (Pst I) 及び816 (Hinc II)。

B群クローンの制限地図は第2図で示されている。SO9遺伝子は下記塩基位置に制限部位を有

する鎖長約1071 ntである: 297 (Pvu II)、381 (Bg I)、570 (Apa I)、750 (Bg I)、789 (Xho I) 及び900 (Pvu II)。SO24遺伝子は下記塩基位置に制限部位を有する鎖長約1108 ntである: 243 (Pvu II)、278 (Bg I)、482 (Apa I)、646 (Bg I)、694 (Apa I)、718 (Xho I)、743 (Ava II)、845 (Pvu II) 及び982 (Apa I)。SO7遺伝子は下記塩基位置に制限部位を有する鎖長約980 ntである: 115 (Pvu II)、150 (Bg I)、361 (Apa I)、518 (Bg I)、561 (Xho I)、564 (Ava II)、717 (Pvu II) 及び861 (Apa I)。SO1遺伝子は下記塩基位置に制限部位を有する鎖長約337 ntである: 75 (Apa I)、236 (Bg I)、261 (Xho I) 及び275 (Ava II)。

C群クローンの制限地図は第3図で示されている。SP54遺伝子は下記塩基位置に制限部位を有する鎖長約687 ntである: 187 (Ava I)、273 (Apa I)、559 (Pst I) 及び627 (Hind III)。SP59遺伝子は下記塩基位置に制限部位を有する鎖長約1017 ntである: 222 (Ava II)、250 (Ava I)、

500 (Ava I)、603 (Apa I)、682 (Apa I)、889 (Pst I) 及び947 (Hind III)。

H群クローンの制限地図は第4図で示されている。SO311遺伝子は下記塩基位置に制限部位を有する鎖長約684 ntである: 154 (Hinc II)、262 (Bg I) 及び400 (Pvu II)。SO227遺伝子は下記塩基位置に制限部位を有する鎖長631 ntである: 257 (Hinc II)、369 (Bg I) 及び537 (Pvu II)。SO231遺伝子は下記塩基位置に制限部位を有する鎖長632 ntである: 255 (Hinc II)、382 (Bg I) 及び514 (Pvu II)。

F群クローンの制限地図は第5図で示されている。SO216遺伝子は下記塩基位置に制限部位を有する鎖長約487 ntである: 49 (Hpa II)、97 (Hha I)、132 (Kpn I)、139 (Sau3A)、176 (Alu I)、200 (Sau3A)、228 (Alu I)、237 (Hae III)、296 (Taq I)、335 (Hinf I)、341 (Taq I)、402 (Hind III)、404 (Alu I)、415 (Hha I)、432 (Taq I)、435 (Xho II)、435 (Sau3A)、455 (Hinf I) 及び477 (Alu I)。最初の8つのnt及び最後の8つのntはリンカーの

ntを表わし、E. テネラ F群遺伝子の一部ではない。

組換え免疫原コクシジウムタンパク質、組換え融合タンパク質及び組換えCheY融合タンパク質、好ましくは組換えCheY融合タンパク質の産生は、単一コロニーから単離された選択組換え細菌のアンピシリン含有2XYT培地中における一夜の培養によって行われる。一夜経過培養物は約500 mlの2XYT+アンピシリンに接種するために用いられる。培養物は中間対数的増殖相が得られるまで曝気下約37℃で増殖せしめられ、その時点でIPTGが最終濃度約100 µMまで加えられる。細胞は更に約3~4時間インキュベートされ、氷冷され、遠心分離により集められる。細胞は洗浄され、遠心分離により集められ、pH約8.0の約30 mMトリスHCl、約5.0 mM EDTA及び約1 mMフェニルメチルスルホニルフルオリドからなる緩衝液A約10 ml中に再懸濁される。細胞懸濁液は、ブランソン (Branson) 細胞破壊器モデル3.50を用いて氷浴中3分間のバーストで維持し

ながら超音波処理される。超音波処理液は、約4℃で約45分間約27,000 xgの遠心分離によって清澄化される。これは最初の上澄液である。ペレット(P₁)は0.1w/v %トリトンX-100含有緩衝液A約10ml中氷浴内で約30分間洗浄され、再遠心分離される。上澄液は集められ、第二の上澄とする。ペレット(P₂)は同じ緩衝液である緩衝液Aで2回洗浄される。洗液は捨てられる。次いで、洗浄されたペレットP₂は約100mMジチオスレイトール含有の約6Mグアニジン-HCl約1.0mlに再懸濁され、懸濁液は約50℃で(約2時間)インキュベートされる。懸濁液は約7M尿素で10mlに希釈され、約4℃で約45分間約27,000xgの遠心分離により清澄化されるが、この上澄液が第三の上澄である。各種融合タンパク質の溶解性の差異に基づき、一部は第一の上澄中にみられ、一部は第二の上澄中にみられ、一部は第三の上澄中にみられる。例えば、免疫原A群SO6-CheYからの代表的クローンタンパク質は、第一、第二及び第三の上澄中に存在した。

B群(SO7)、C群(SP54)、H群(SO311)及びF群(SO216)のクローンからの代表的タンパク質は、第三の上澄中に存在した。SO7-CheY及びSP54-CheY双方の融合タンパク質は、ヒドロキシアパタイト上でのクロマトグラフィーにより遅れて溶出することはなかった。SO311-CheY融合タンパク質はヒドロキシアパタイトと結合し、160mMリン酸緩衝液で溶出させることができた。第三の上澄液からのSO6-CheY融合タンパク質はトリサクリルM-DEAEクロマトグラフィーにより更に精製された。

代表的アイメリア免疫原クローンは、3つの標準的技術のうち1以上で各々の特定遺伝子のヌクレオチド配列を決定するためにアッセイされる。一部の場合においては、cDNAのヌクレオチド配列はマキサム及びギルバート、メソッズ・イン・エンザイモロジー、第65巻(第1部)、第497-559頁、1980年(Maxam and Gilbert, Method in Enzymology, 65 (part 1):

497-559(1980))の化学的分解方法を用いて決定される。更にルーチンには、ヌクレオチド配列はハットリ及びサカキ、アナライティカル・バイオケミストリー、第152巻、第232-238頁、1986年(Hattori and Sakaki, Analytical Biochemistry, 152: 232-238 (1986))で記載されているように変性プラスミド鑄型(アイメリアcDNAの類型化サブ配列を含むプラスミドpUC18)を用いたジデオキシ鎖末端化技術によって決定される。最後に、一部のヌクレオチド配列は、cDNAインサート又はその一部をバクテリオファージmp18に組込んでサブクロニングしかつメッシング(Messing)、メソッズ・イン・エンザイモロジー、第101巻、第20-78頁、1983年の標準的ジデオキシ鎖末端化配列決定法を用いて分泌された一本鎖組換えファージ鑄型を配列決定することにより決定される。AMVリバーシトランスクリプターゼ及びDNAポリメラーゼIのクレノウフラグメントに加えて、修正T7 DNAポリメラーゼが用いられた(テーパー(Tabor)及

ブリチャードソン(Richardson)、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンスUSA:第84巻、第4767-4771頁、1987年参照)。

アミノ酸配列は、下記情報を組合せることにより決定されたヌクレオチド配列から導き出される。ファージ発現ベクターrgt11中の各々のcDNAは、β-ガラクトシダーゼと共に融合タンパク質として発現された場合に、ポリクローナル抗血清を用いて確認される。β-ガラクトシダーゼと免疫原間の融合結合は、リンカー領域内で、β-ガラクトシダーゼのカルボキシ末端を免疫原のN末端におけるPhe残基と結合させたGly残基からなる。EcoRI制限酵素は、5'側から3'側に読んだ場合にGluコドンの第一及び第二ヌクレオチド間を開裂する。EcoRI開裂部位におけるこの結合(及び読取り枠、クロニング部位)は、サブクロニングベクターpUC18、mp18又はpJC264の有無に係わらず完全cDNAを要する各々の後のクロニング時に再生される。

その結果、読取り枠は明確に確認することができ、これら3つのベクター中におけるインサートの方向が決定されると直ちにヌクレオチド配列が翻訳される。プラスミドpUC18及びpJC264又はファージmp18のベクター中におけるcDNAインサートの方向決定は、当業界で公知の制限酵素地図作成によって行われる。非対称制限酵素認識配列がcDNAインサート内で確認されると、インサート方向及び転写方向は認識配列がヌクレオチド配列から同様に予測される場合において明確に決定される。本明細書で示されたすべてのアミノ酸配列は、アミノ末端からカルボキシル末端にかけて読取られる。

A群クロンのヌクレオチド配列及び得られるA群免疫原アミノ酸配列は、代表的クローンS067で例示される。このクローンはS06クローンの中に完全に含まれる。このクローンにおける約870ヌクレオチドのうち、5'末端から始まる最初の162ヌクレオチドが配列決定された。転写方向及びひいては正確な読取り枠は、CheY

内に完全に含まれる。このクローン中における約700ヌクレオチドのうち、5'末端で始まる最初の157ヌクレオチドが配列決定された。転写方向及びひいては適切な読取り枠は、ヌクレオチド配列中の制限酵素認識配列をCheY-S P54組換えプラスミドの制限酵素地図作成から予測されるそれらの非対称位置と対比させることによって明確に導き出すことができる。ヌクレオチド配列及び得られる52アミノ酸配列は第9表で示されている。

H群クロンヌクレオチド配列及び得られるH群免疫原アミノ酸配列は、代表的クローンS0311で例示される。このクローン中の約650のヌクレオチドのうち5'末端の最初の185ヌクレオチドが配列決定された。転写方向及びひいては適切な読取り枠は、ヌクレオチド配列中の制限酵素認識配列を制限酵素地図作成から予測されるそれらの非対称位置と対比させることにより明確に導き出すことができる。ヌクレオチド配列及び得られる61アミノ酸配列は第10表で示される。3'

-S067組換えプラスミドの制限酵素地図作成から予測される制限酵素認識配列のヌクレオチド配列中の位置に基づき明確に導き出すことができる。ヌクレオチド配列及び得られる53アミノ酸配列は第6表で示されている。更に221のヌクレオチド配列は、第7表で示されているように、クロンの3'末端から得られたが、但し読取り枠は導き出されなかった。

B群クロンヌクレオチド配列及び得られるB群免疫原アミノ酸配列は、代表的クローンS07で例示される。このクローンにおける957ヌクレオチドのすべてが配列決定された。読取り枠は、cDNA内で非対称的に存在する制限酵素部位の位置をヌクレオチド配列分析から予測されるそれら各々の認識配列の位置と対比させることによって明確に導き出すことができる。ヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は第8表で示されている。

C群クロンヌクレオチド配列及び得られるC群免疫原アミノ酸配列は、代表的クローンS P54で例示される。このクローンはS P59クローン

末端の最後の283ヌクレオチドは配列決定されたが、その読取り枠は導き出されていない(第11表参照)。

上記cDNAでコードされる一次翻訳産物の分子量は、適切なmRNA群の生体外翻訳によって決定される。非孢子形成囊胞体、孢子形成囊胞体及び種虫から抽出されるmRNAの生体外翻訳は、組込まれるインジケーターアイソトープとしての³⁵S-メチオニン又は³H-ロイシンいずれかと共に、ウサギ無網状赤血球細胞翻訳系を用いて行われた。特異的生体外翻訳産物は、実施例6で記載のように単一特異性抗体を用いて免疫沈降せしめられた。生体外翻訳用のプロトコルは、(製造者の指示に従う)プロメガ・バイオテック

(Promega Biotec)の技術誌に記載されており、テラーら、モレキュラー・バイオケミカル・パラサイトロジー、第10巻、第305-318頁、1983年の場合と同様の免疫沈降法に関するものであった。クローンS06及びS067で例示されるA群抗原に対して特異

的な抗体により免疫沈降せしめられた生体外翻訳産物は、約24キロダルトン(kD)の分子量を有する。クローンS O 7で例示されるB群抗原に対して特異的な抗体により免疫沈降せしめられた生体外翻訳産物は約28kDの分子量を有するが、一方副次的な免疫原は約170、24、22、16及び12kDの分子量を有する。他の副次的な特異的免疫沈降性生体外翻訳産物は、 ^3H -ロイシンが標識前駆体アミノ酸として用いられた場合に検出可能である。170及び22kDの副次的免疫原も ^{35}S -メチオニンで検出可能である。主な28kD免疫原は、 ^3H -ロイシンが前駆体アミノ酸として用いられた場合にのみ検出可能である。クローンS P 5 4及びS P 5 9で例示されるC群抗原に対して特異的な抗体により免疫沈降せしめられた生体外翻訳産物は調べられなかった。クローンS O 3 1 1で例示されるH群抗原に対して特異的な抗体により免疫沈降せしめられた生体外翻訳産物は約28kDの分子量を有し、一方副次的免疫原は48、38、33、16、13、12及び10

kDの分子量を有する。他の副次的な特異的免疫沈降性生体外翻訳産物は、 ^{35}S -メチオニンが標識前駆体アミノ酸として用いられた場合に検出可能である。主な28kD免疫原は、 ^{35}S -メチオニン及び ^3H -ロイシンの双方が用いられた場合に検出可能である。

E. テネラの胞子形成嚢胞体及び/又は種虫から抽出された特異的mRNAは、マニアティスら、分子クローニング、実験マニュアル、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー；コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク、第202頁、1982年(Maniatis et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pg. 202 (1982))の方法及びS & S固体支持相への核酸の移入及び固定(Transfer and Immobilization of Nucleic Acids to S & S Solid supports)、シュレーチャー及びシュエル社(Schleicher and Schuell Inc.)発行、第16-19頁、1987年に記載された方法に従い、ノ

ザンブロット分析でサイズ分けされた。クローンS O 6及びS O 6 7で例示されるA免疫原についてコードするmRNAは、鎖長 2.15 ± 0.13 キロ塩基(kB)である。クローンS O 7で例示されるB免疫原についてコードするmRNAは鎖長 1.23 ± 0.22 kBである。クローンS P 5 4及びS P 5 9で例示されるC免疫原についてコードするmRNAは鎖長 1.12 ± 0.08 kBである。クローンS O 3 1 1で例示されるH免疫原についてコードするmRNAは鎖長 0.98 ± 0.07 kBである。

天然免疫原B及びCは、ゲル濾過及び特異的抗CheY免疫原抗体による同定又は特異的抗CheY免疫原抗体を用いる免疫アフィニティークロマトグラフィーのいずれかによってE. テネラから単離される。約 1×10^9 のアイメリア・テネラ胞子形成嚢胞体は、氷浴中約2.5分間バーストで約10分間、緩衝液、好ましくは約0.1mM PMSF含有リン酸緩衝液中で超音波処理される。破壊された胞子形成嚢胞体は、4℃で30分間27,000xgの遠心分離により集められる。ペレットは約

0.1mM PMSF含有PBS約40mLで約3回洗浄され、上記のように遠心分離で回収される。洗浄されたペレットはpH約8.6の約400mgジチオスレイトール含有約5MグアニジンHCl/約0.5MトリスHCl約60mLに再懸濁される。還元は、中度の攪拌下20℃で約3時間行われる。還元されかつ可溶化された免疫原は、上澄液の遠心分離及び収集によって得られる。免疫原は好ましくは限外濾過により約20mLに濃縮され、ヨード酢酸約400mgの添加によってカルボキシメチル化される。pHは3Mトリス塩基の添加で約8.6に調節され、反応は暗所中約20℃で約60分間続けられる。グアニジンHClは約0.05M NH_4HCO_3 、約0.1M PMSF及び約0.02%アジ化ナトリウムに対する約48時間の透析によって除去される。すべての不溶性物質は遠心分離によって除去される。上澄液は限外濾過により濃縮され、ゲル濾過クロマトグラフィーにより分離される。サンプルは、約0.05M NH_4HCO_3 、約0.1%ツビクサージェント3-12及び約0.02

%アジ化ナトリウムで平衡化された約 87×2.5 cm のセファクリル (Sephacryl) S-200 のカラムに供される。約 4.5 ml の画分は約 25 ml/hr の流速で集められ、約 280 nm でモニターされる。E. テネラ免疫原の存在は、ウエスタンブロット法により、ウサギ抗種虫抗血清及び特異的 E. テネラ組換え融合免疫原に対して産生された抗体で調べられる。天然免疫原は、コクシジウム感染から鶏を保護することができる。

天然 E. テネラ免疫原 A、B、C、H 及び F は、特異的融合免疫原に対して産生された抗体を用いた免疫アフィニティークロマトグラフィーにより胞子形成嚢胞体から単離されかつ精製される。アフィニティークラムは、前免疫血清及び特異的融合免疫原血清を用いて調製される。免疫グロブリン G (IgG) 画分は、コーチャーら、ジャーナル・オブ・イムノロ・メソ、第 66 巻、第 75-79 頁、1984 年 [Corthier et al., J. Immunol. Meth. 66:75-79 (1984)] の方法又はハーン (Hearn) ら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル

少なくとも 1 つの抗原決定基又はエピトープを共有する他のアイメリア種由来免疫原は、E. テネラ B 群免疫原に対して特異的な抗体を用いて確認されかつ単離される。1 以上の共通免疫原を有する他の種としては、E. アセルブリナ (E. acervulina)、E. ミバチ (E. mivati)、E. ミチス (E. mitis)、E. プレアコックス (E. preacox)、E. ハガニ (E. hagani)、E. ネカトリックス (E. necatrix)、E. マキシマ (E. maxima) 及び E. バーネッティ (E. burnetti) がある。抗体は上記のようにして得られるが、ポリクローナル又はモノクローナルのいずれであってもよい。抗体を産生するために用いられる免疫原としては、天然 B 群免疫原又はいずれの B 群クローンからも発現される組換えタンパク質があるが、SO7 クローン免疫原が好ましい。組換え免疫原は個別的タンパク質又は融合タンパク質のいずれであってもよいが、SO7-CheY 融合タンパク質免疫原が好ましい。

B 群 E. テネラ免疫原と 1 以上のエピトープを

ケミストリー、第 254 巻、第 2572-2574 頁、1979 年のカルボニルジイミダジド法によって得られる。IgG 約 15 mg は、シュナイダート (Schneider) ら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、第 257 巻、第 10766-10769 頁、1982 年の方法を用いてセファロースタンパク質 A (シグマ) 0.5 g に結合せしめられる。pH 8.1 の約 0.5 M NaCl、約 0.02 % アジ化ナトリウム及び約 0.1 mM PMSF 含有約 0.1 M ホウ酸緩衝液中上記のように製造された E. テネラ胞子形成嚢胞体の還元カルボキシメチル化抽出物約 5 mg は、同一緩衝液で平衡化された前溶出カラムに供される。前溶出カラムはカラム緩衝液 3 ml で洗浄され、合わせたカラム溶出液及び洗浄は同一緩衝液で平衡化された抗 E. テネラ融合免疫原カラムに供される。カラムはカラム緩衝液約 10 ml で洗浄され、天然免疫原は約 3 M チオシアネートナトリウムで溶離される。個々の天然免疫原は、コクシジウム感染から鶏を保護することができる。

共有する様々なアイメリア種に係わる免疫原は、各個別種の胞子形成嚢胞体及び種虫から得られる免疫原の免疫ブロットによって確認される。胞子形成嚢胞体及び種虫は物理的に破壊され、タンパク質は SDS ポリアクリルアミド勾配ゲル電気泳動により分離され、ニトロセルロースに移される。移動したタンパク質は抗 SO7-CheY 抗体と反応せしめられ、結合抗体は 125 I-タンパク質 A で検出される。

天然 B 群免疫原は、超音波、還元及びカルボキシメチル化によってアイメリア種胞子形成嚢胞体から単離される。還元カルボキシメチル化タンパク質はサイズ排除クロマトグラフィーで予め精製されてもよい。抗 B 群抗体含有免疫アフィニティークマトリックスは、前記ベセルら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、第 254 巻、第 2572-2574 頁、1979 年の技術を用いて調製される。E. テネラ以外の他のアイメリア種から単離された B 群免疫原も、コクシジウム感染症から鶏を保護することができる。

アイメリア免疫原の分子量及び等電点も調べられた。分子量は、E. テネラの孢子形成嚢胞体及び／又は種虫から得られたサンプルの分析ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)、しかる後ニトロセルロース移動及び前記ウエスタンブロット法による免疫検出によって調べられた。適切な分子量コントロールも含まれている。等電点は、オーファレル(O' Farrell)、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、第250巻、第4007-4021頁、1979年の操作に従い二次元ゲルラン(run)のウエスタンブロット法により調べられた。両操作の抗体は上記のように得られる。免疫原Aは、分子量24キロダルトン(kD)の単一バンドとして分離された。主なB免疫原はSDS-PAGE上27-28kDの拡散ダブルットとして特徴付けられ、一方副次的免疫原は微弱バンドとして現われることから、E. テネラ内で抗原決定基が一部重複していることを示唆している。副次的バンドは、22、19、18、14、12、

9及び6kDの分子量を有している。27-28ダブルットは、pH5.1及び6kD間の範囲内で等電点フォーカシング(focusing)時多数のスポットを生じる。ウエスタンブロット法で検出された他の微弱バンドのpHは測定されなかった。免疫原Cも分子量21-22kDのダブルットとして移動する。免疫原Hは、分子量28及び18kDの2つの異なる主タンパク質並びに分子量27、24、23、17、14、12及び9kDの7つの副次的タンパク質として分離する。F群免疫原は約26-29kDの分子量を有する。免疫原Aの等電点は3.65で、pHは6.65である。C及びFの等電点は測定されなかった。

家禽には、前記組換えアイメリア・テネラ免疫原の1以上の免疫化用量が投与される。鶏への免疫原投与は経口でも非経口経路であってもよく、鶏胚は卵殻を介して接種される。これらいずれかの経路による免疫原の投与は、免疫原単独としてでも又は生理学上許容される媒体との溶液もしくは懸濁液としてであってもよい。このような生理

学上許容される媒体としては、格別限定されないが、生理塩水、リン酸緩衝液、リン酸緩衝液、グルコース緩衝液等がある。非経口投与としては、特にE. テネラ免疫原の筋肉内、腹腔内、皮下及び静脈内注射又は放出がある。経口投与される免疫原は水性溶液又は懸濁液の形である。懸濁液は、例えばゼラチン又はアルギネートからなるゲル中に免疫原を含んでいる。経口投与される免疫原は飼料中に含有されていてもよい。胚含有卵は、1以上のアイメリア免疫原の免疫原性用量の注射によって免疫処理される。筋肉内及び皮下予防接種用免疫原は、許容しうるアジュバントと共に投与されてもよい。許容しうるアジュバントとしては、格別限定されず、フロイント完全液、フロイント不完全液、二重エマルジョン、無水油、ミョウバン沈降物、コリネバクテリウム・バルブム及びtRNA含有油中水型エマルジョンがある。好ましいアジュバントは、免疫原がアルヒドロゲル(Alhydrogel™)のような水酸化アルミニウムで沈降せしめられたミョウバン沈降物である。組換

えE. テネラ免疫原による鶏の免疫処理の結果、コクシジウム症に対する免疫が生じる。保護免疫は、約1.0ng〜約100μg、好ましくは約100ng〜約10μgの投与によって獲得される。

下記実施例は本発明を説明しているが、本発明はそれらに限定されるものではない。

実施例1

嚢胞体、孢子形成嚢胞体、種虫及び裂虫並びに対応免疫原及び抗原の調製

アイメリア・テネラ嚢胞体を7日前に感染した鶏の盲腸コア(嚢胞体の合体物)から単離した。アイメリア・アセルブリナ嚢胞体を5〜6日前に感染した鶏の糞及び腸内容物から単離した。単離された盲腸コア及び糞をウエアリング・ブレンダー内(蒸留水中)で別々に破壊し、39℃pH2.0で1時間ペプシン(2mg/ml)により分解した。大量の破壊屑及びペプシンを蒸留水中で遠心分離(1000×g)後ペレット物質から除去した。部分的純粋嚢胞体画分を2.2Mスクロース中での浮遊化によりペレットから単離し(ジャクソン、バ

ラサイトロジー、第54巻、第87-93頁、1964年)、この粗製物質を冷クロックス(5.25%次亜塩素酸ナトリウム、4℃)中で10分間インキュベートすることにより更に処理した。次亜塩素酸ナトリウムをpH7.6の無菌リン酸緩衝液(PBS)中数回の洗浄で除去し、精製された無菌嚢胞体を得た。嚢胞体を20℃で48時間振盪水浴中で孢子形成させた(エドガー、トランサクションズ・オブ・アメリカン・マイクロバイオロジー・ソサエティー、第62巻、第237-242頁、1954年)。孢子形成嚢胞体を4℃でPBS(pH7.6)中において貯蔵した。

十分に孢子形成した嚢胞体をブランソニック細胞破壊器内の氷上で先細プローブにより超音波処理した。超音波処理は、加熱を防止するために30秒間オン/オフサイクルで行われた。この操作により、90%破壊を10~15分間で行なった。界面活性剤(ツビッタージェント3-12、カルビオケム、0.1% w/v)を加え、混合物を4℃で18時間攪拌した。27,000 xgで30分間遠心分

かった。

第二世代裂虫を、ジェームス、パラサイトロジー(James, Parasitol)、第80巻、第301-312頁、1980年のプロトロールに従い感染後4日目に鶏腸細胞から得た。

抗体産生用の免疫原を下記のようにして得た。精製された孢子形成嚢胞体の懸濁液2ml(5×10⁷/ml PBS、pH7.6)をゆるめた乳棒装備組織ホモゲナイザー中4℃500rpmで5分間粉碎し(バットン、サイエンス、第150巻、第767-760頁、1965年)、嚢胞体破壊物から得られる上澄液を遠心分離(600xgで10分間)後除去した。非破壊嚢胞体、スポロシスト及び嚢胞体外被からなるE、テネラベレットをハックス平衡塩溶液(pH7.4)中0.25%(w/v)トリブシン(1:250)及び4.0%(w/v)タウロデオキシコリン酸(シグマ)含有脱嚢用溶液に再懸濁し、5% CO₂中41℃でインキュベートした(バットンら、ジャーナル・オブ・パラサイトロジー、第65巻、第526-530頁、1979

離後、上澄液をセファデックスS-200(ファルマシア)のゲル浸透クロマトグラフィーに供した。

セファデックスS-200カラム(8×44cm)を4℃においてpH7.2の50mM Na₂HPO₄-NaH₂PO₄及び0.1%ツビッタージェント3-12で平衡化させた。超音波処理物をカラムに施し、同一緩衝液で溶離し、画分を集め(14ml)、230nmの吸光度によりモニターした。画分をSDS-PAGE特性に従いプールした。プールされた画分を4℃で1週間にわたり緩衝液を3回交換して10mM炭酸水素アンモニウム8リットルに対して透析し、しかる後凍結乾燥した。凍結乾燥画分をガラス蒸留水に溶解し、生体内鶏保護活性について試験した。生体内活性は、画分84-94間でルーチン的に見出された。保護アイメリア・テネラ画分をプールし、画分Vと命名した。一部のバッチの場合には、S-200クロマトグラフィーをpH7.7の0.05%ツビッタージェント含有50mM炭酸水素アンモニウム中に行なった。これは溶出特性又は生体内効力に関して効果を有していな

年)。同様に非破壊嚢胞体、スポロシスト及び嚢胞体外被からなるE、アセルブリナベレットもハックス平衡塩溶液(pH7.4)中0.125%(w/v)トリブシン(1:250)及び1.0%タウロデオキシコリン酸含有脱嚢用溶液に再懸濁した。ベレットを5% CO₂含有雰囲気中41℃でインキュベートした。脱嚢処理をE、アセルブリナの場合0.5時間及びE、テネラの場合1時間続け、しかる後脱嚢用溶液を遠心分離により除去し、寄生虫物質をpH8.0イオン強度0.145の1%グルコース含有リン酸緩衝塩/グルコース(PBSG)緩衝液で2回洗浄した(シュマッツら、ジャーナル・オブ・プロトゾール(J. Protozool)、第31巻、第181-183頁、1984年)。寄生虫混合物をPBSGで平衡化されたDE52アニオン交換カラムに供したが、精製された種虫は放出分について遅滞することなく溶出した(シュマッツら、上記)。

種虫を(ドライアイス~室温で)3回凍結-解凍させ、プロテアーゼ阻害剤としての1mMフェニ

ルメチルスルホニルフルオリド含有PBS中破壊されるまで超音波処理し、種虫抗原を得た。タンパク質濃度をローリーら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、第193巻、第265-275頁、1951年の方法により測定し、抗原を液体窒素中で貯蔵した。

実施例2

抗アイメリア・テネラの非孢子形成嚢胞体、孢子形成嚢胞体、種虫、裂虫、画分V及び抗アイメリア・アセルブリナ種虫抗体の産生

ウサギ（ニュージーランドホワイト（New Zealand White）、雌性）を実施例1に記載された様々な免疫原のうち1つで複数回免疫処理した。各免疫用量はタンパク質50 μ gを含有していた。初回免疫は、フロイント完全アジュバントで行なった。後の免疫はフロイント不完全アジュバントで行なった。抗原アジュバント混合物は、PBS中タンパク質50 μ g含有抗原0.5mlをアジュバント0.5mlで乳化させることにより調製した。次いで、エマルジョン1mlをウサギ背中の剃毛

面上の複数部位に皮下注射した。二次追加免疫は、一次免疫後約1か月間隔で行なった。動物を放血させ、免疫スケジュール開始後6週間目から始めて約1か月間隔で免疫血清を調製した。免疫活性及び特異性は、実施例1の特異的抽出抗原及びトービンら、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンスUSA、第76巻、第4350-4354頁、1979年の技術を用いてウエスタンブロット分析により測定した。各抗体はその対応免疫原、即ち抗原に対して特異的であった。

実施例3

画分V免疫原によるコクシジウム症に対しての2日令鶏の免疫

ブロイラー鶏を実施例1に記載の画分V免疫原で免疫した。用量はローリーら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、第193巻、第265-275頁、1951年の方法で測定した場合のタンパク質含有量に基づくものであるが、これをふ化後2、9及び16日目に筋注した。実

験用及びコントロール用鶏を最終免疫後1週間目に 5×10^3 E. テネラ嚢胞体の経口接種により侵襲させた。侵襲後6日目に鶏を殺し、盲腸内における障害の重篤度をジョンソン及びレイド、エクスペリメンタル・パラサイトロジー、第28巻、第30-36頁、1970年（Johnson and Reid, Experimental Parasitology 28:30-36 (1970)）の方法に従い測定した。

下記結果が得られた。

第4表

免疫原	用量 (μ g)	鳥の数	平均グループ 障害評点
画分V	10.0	8	1.0
画分V	1.0	8	1.6
画分V	0.10	8	2.9
なし	—	8	3.4

これらの結果は、画分V免疫原が2日令鶏を免疫するために使用しうることを示している。筋肉内接種は、通常の毒性感染後免疫鳥における重度

障害発生の非存在から示されるように、疾患に対して高レベルの保護を与える。

実施例4

アイメリア・テネラ種虫からのゲノムDNAの調製

実施例1の精製アイメリア・テネラ種虫を種虫 1.5×10^6 /mlの濃度でTE培地（pH7.5の10mMトリスHCl、0.1mM EDTA）に懸濁した。次いで、種虫の希懸濁液をSDS（20% SDS貯蔵液から）中0.5%及びEDTA（pH8.0の0.5M貯蔵液から）中15mMに調節し、原形質膜及び核膜の双方を溶解させた。核溶解後のゲノムDNA放出は、溶液粘度の明白な増加によって確認される。可溶化を助けるために、溶液をプラットフォーム（platform）上50℃で30～60分間穏やかに揺動し、しかる後50℃で3時間 100μ g/mlの濃度のプロテイナーゼKで分解させる。ゲノムDNAを、フェノールによる2回の抽出、フェノール、クロロホルム及びイソアミルアルコール（25:24:1）の混合物によ

る2回の抽出、クロロホルム及びイソアミルアルコール(24:1)による2回の抽出、並びに実施例8で記載のような酢酸ナトリウム/エタノールによる2回の連続的沈降によって精製した。核酸ペレットを70%エタノールで2回洗浄し、 5×10^8 種虫相当数/mlのおよその濃度でTEに懸濁させる。核酸のRNA成分を37℃で60分間濃度 $50 \mu\text{g/ml}$ の熱不活性化RNAアーゼAによる分解によって選択的に除去する。RNAアーゼA及び他の残留タンパク質を上記のように50℃で3時間0.5%SDS及び15mMEDTA中のプロテイナーゼKによる二次分解によって除去した。次いで、ゲノムDNAを有機溶媒で連続的に抽出し、エタノールで2回沈降させ、しかる後70%エタノールで2回洗浄した。ゲノムDNAペレットを $2 \sim 3 \times 10^8$ 種虫相当数/mlの濃度でTEに懸濁し、260nmの吸光度から定量した。次いで、非分解ゲノムDNAを分析用ゲルで分別化し、(i)分光測定濃度、(ii)残留RNAの非存在及び(iii)その高分子量保全性(integrity)

について確認した。

実施例 5

cDNA発現ライブラリーの作成

7時間胞子形成されたE. テネラ嚢胞体及び種虫を前記のようにして得た(シュマッツら、上記; ワン(Wang)及びストティッシュ(Stotish)、ジャーナル・オブ・プロトゾロジー、第22巻、第438-448頁、1975年)。全RNAを、チャークウィンらの方法(バイオケミストリー、第18巻、第5294-5299頁、1979年)により、単離直後(即ち、種虫)又は液体窒素で凍結され-80℃で貯蔵された細胞ペレット(即ち、7時間胞子形成嚢胞体)から各段階で単離した。細胞壁が存在するため、嚢胞体サンプルを4倍量の4Mグアニジウムチオシアネート溶液(細胞ペレット量と比較した溶液量)に再懸濁し、ブランソン(Branson)超音波器(ヒート・システム・ウルトラソニクス(Heat System Ultrasonics))により20W、50%サイクルで全部で30分間超音波処理した。種虫はグアニジウムチオシアネ

ート貯蔵溶液(4Mグアニジウムチオシアネート、0.5%N-ラウロイルサルコシン、pH7.0の25mMKエン酸ナトリウム及び0.1M 2-メルカプトエタノール)の添加により溶解したことから、超音波処理は不要であった。次いで、溶解した細胞をベックマン(Beckmann)JS-13ローター中10℃、8000rpmで10分間遠心分離し、粒状の細胞破壊屑を沈降させた。上澄を清潔なフラスコ中にデカントし、1M酢酸0.025倍容量及び無水エタノール0.75倍容量と混合した。フラスコを十分に振盪し、-20℃で一晩放置して、核酸を沈降させた。翌日、RNAをベックマンJS-13ローター中10℃、8000rpmで10分間の遠心分離により集めた。管から放液させて、細胞ペレットを緩衝化された塩酸グアニジン貯蔵溶液(7.5M塩酸グアニジン、pH7.0の0.025MKエン酸ナトリウム及び5mMジチオスレイトール)0.5倍容量に再懸濁した。塩酸グアニジン貯蔵溶液の容量は、先に使用されたグアニジウムチオシアネート溶液の容量と比較したも

のである。1M酢酸0.025倍容量及び無水エタノール0.5倍容量を加えることによって、RNAを沈降させた。溶液を-20℃に一夜保ち、RNAをもう一度遠心分離によって集めた。先の沈降で用いられた容量の半分の塩酸グアニジン貯蔵溶液を用いて、塩酸グアニジン沈降を繰返した。再沈降RNAを95%エタノールで洗浄し、乾燥し、無菌水に再懸濁した。この物質を10℃、10,000rpm(ベックマンJS-13ローター)で30分間遠心分離した。上澄液を除去し、ペレットを無菌水に再懸濁した。遠心分離工程を繰返した。上澄液を合わせ、pH5の2M酢酸カリウム0.1倍容量及び無水エタノール2倍容量と混合し、-20℃で一晩放置して沈降させた。DNAペレットを10,000rpm(ベックマンJS-13ローター)で30分間の遠心分離により集め、乾燥し、無菌水に再懸濁した。RNAの濃度を分光測定により調べた。

ポリアデニル化RNAをオリゴ(dT)-セルロースクロマトグラフィーにより選択した(アビ

ブ及びレーダー、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サンエンスUSA、第69巻、第1408-1412頁、1972年)。

1mlカラムを用意するために、オリゴ(dT)-セルロース(ベセスダ・リサーチ・ラボラトリーズ、BRL) 0.3gを溶離用緩衝液(10mMトリスHCl、pH7.5)に再懸濁し、パスツールピペット中に注いだ。使用前、カラムを結合用緩衝液(0.5M塩化リチウム、0.5%ドデシル硫酸ナトリウム、pH7.5の10mMトリスHCl及び1mMエチレンジアミン四酢酸)10倍層容量で洗浄した。

無菌水に溶解されたRNA(0.5mg)を68℃で5分間加熱し、氷で室温まで冷却した。等容量の2×結合用緩衝液を加え、十分に混合し、サンプルをカラムに供した。カラムを結合用緩衝液50mlで洗浄後、ポリ(A⁺)-RNAを溶解用緩衝液10mlで溶出させた。10の1ml画分を集め、各々のRNA濃度を波長260nmで分光測定により調べた。最も高い吸光度の画分をプールし、pH5.0の2M酢酸カリウム0.1倍容量及び無水エ

タノール2倍容量を加えることによりRNAを沈降させた。サンプルを-20℃で一晩放置し、RNAを上記のような遠心分離により集めた。沈降後、サンプルを無菌水に再懸濁し、各々の濃度を分光測定により再度調べた。

ポリ(A⁺)-RNA 7.5μgから開始するため、第一及び第二鎖cDNA反応をガブラー(Gubler)及びホフマン(Hoffman)(ジーン、第25巻、第263-269頁、1983年)により記載されているように行った。cDNAの第一鎖の合成は、pH8.3の50mMトリスHCl、10mM MgCl₂、10mM DTT、4mMピロリン酸ナトリウム、1.25mM dGTP、1.25mM dATP、1.25mM TTP、0.5mM dCTP、(α-³²P)dCTP 15μCi(3000Ci/mmol)、オリゴ(dT)₁₂₋₁₈ 100μg/ml、AMVリバーシトランスクリプターゼ3000単位/ml(ビアード(Beard)、ライフサイエンス(Life Sciences)、セントピーターズバーグ、フロリダ州)含有反応液40ml中42℃で30分間行

なった。生成物をフェノール/クロロホルムで抽出し、2M NH₄-アセテートから無水エタノールで沈降させた(オカヤマ及びバーク、モレキュラー・アイド・セル・バイオロジー、第2巻、第161-170頁、1982年)。ペレットを70%エタノールで洗浄し、乾燥し、無菌水40μlに再懸濁した。

第二鎖合成の場合には、一本鎖cDNA 500ng(即ち、cDNA/mRNAハイブリッド1μg)をpH7.5の20mMトリスHCl、5mM MgCl₂、10mM (NH₄)₂SO₄、100mM KCl、0.15mM β-NAD、BSA 50μg/ml、dATP、dGTP、dCTP及びdTTP各40μM、大腸菌RNアーゼH(ファルマシアP-Lバイオケミカルズ社)8.5単位/ml及び大腸菌DNAポリメラーゼI(ファルマシアP-Lバイオケミカルズ社)230単位/mlの100μlに再懸濁した。インキュベートを12℃で60分間及び22℃で60分間連続的に行った。EDTAを20mMまで加えて反応を停止させ、生成物をフェノール

/クロロホルムで2回抽出した。二本鎖cDNAを前記のように2M NH₄-アセテートから無水エタノール2倍容量で沈降させた。

次いで、cDNA(500ng~1μg)をpH7.5の50mMトリスHCl、1mM EDTA、5mM DTT及び10μM S-アデノシルメチオニン含有1×EcoRIメチラーゼ緩衝液20μl中でメチル化した。反応をEcoRIメチラーゼ(ニューイングランド・バイオラブズ)20Uの添加後20℃で20分間行った。反応を終了させるために、酵素を70℃で15分間かけて熱不活性化させた。サンプルを氷冷し、cDNAを下記のようにしてプラント末端化させた。EcoRIメチル化cDNA 21μl含有チューブに、0.1M MgCl₂ 2.5μl、0.2mM d(A、C、G、T)TP 2.5μl及びT4DNAポリメラーゼ(BRL)5単位を加えた。反応を20~22℃で10分間行い、最終濃度15mMまでのEDTA添加により終了させた。反応生成物をフェノール/クロロホルムで2回抽出し、上記のようにエタノールで沈

降させた。

前記反応からのベレットをpH 7.6の70 mM トリスHCl、10 mM MgCl₂、5 mM DTT及び1 mM ATP含有緩衝液中100 µg/ml キナーゼ処理EcoRIデキサスクレオチドリinker (BRL) 4.5 µlに再懸濁した。T4 DNAリガーゼ(ニューイングランド・バイオラプス、200 U/0.5 µl)を加え、反応混合物を12℃で一夜インキュベートした。次いで、リンカー結合cDNAをEcoRI (BRL)で完全に切断した。一夜インキュベート液5.5 µlに、EcoRI修正緩衝液(pH 7.5の50 mM トリスHCl、10 mM MgSO₄、200 mM NaCl) 5 µlを加えた。混合物を70℃で10分間加熱し、リガーゼを不活性化させた。反応混合物の容量をpH 7.5の100 mM トリスHCl、50 mM NaCl及び10 mM MgCl₂で2倍(20 µl)に増加させ、EcoRI制限エンドヌクレアーゼ(16単位/µl) 2 µlを加えた。切断を37℃で1時間続け、しかる後酵素を65℃で20分間熱不活性化させた。生成物を上記のようにし

て沈降させた。

反応混合物から切断されたリンカーを除去するために、cDNAをエルチップ-dカラム(シュレーチャー及びシュエル)で更に精製した。最後に、cDNA(300 ng)を市販品のEcoRI切断されたアルカリホスファターゼ処理rgt11ベクターDNA[プロメガ・バイオテック(Promega Biotec)] 7.5 µgに結合させた。結合混合物中のベクター対ドナーのモル比は1:1であり、DNAの最終濃度は約200 µg/mlであった。結合反応をpH 7.5の10 mM トリスHCl、10 mM MgCl₂中で行った。λベクターの付着端をアニーリングするために、混合物を最初に42℃で15分間インキュベートした。次いで、それを1 mM ATP、10 mM DTT及びT4 DNAリガーゼ(ニューイングランド・バイオラプス) 40,000単位/mlで補足した。反応液を14℃で一夜インキュベートした。

λベクターハイブリッドを製造者の指示(アマージム)に従い市販のパッケージ化用抽出物で

生体外においてパッケージ化した。パッケージ化ファージの少量を大腸菌宿主Y1088株(ヒューインら、*cDNAクローニング:実務的アプローチ*、第1巻、グローバー、D編集、IRLプレス、オックスフォード、第49-78頁、1985年)中に形質導入し、これらをX-gal 600 µg/ml及び16 mM IPTG含有LB(バクトトリプトン(Bactotryptone)10 g/l、バクトー酵母エキス5 g/l、NaCl 10 g/l、pH 7.5)軟寒天2.5 mlを用いてLBプレート上で培養した。各々約1×10⁷の独立組換えファージクローンからなる2つのcDNAライブラリーを得た。X-gal/IPTGプレート増殖から測定した場合、非組換えバックグラウンドは13%であると評価された。

実施例 6

rgt11 cDNAライブラリーのスクリーニング

実施例2の抗画分V抗体又は抗種虫抗体いずれかによる実施例5のcDNAライブラリーのスク

リーニングは、前記ヒューインらによる記載のとおり実質上行われた。非増幅cDNAライブラリーからのパッケージ化ファージを大腸菌Y1090株中に形質導入し、0.5~1.0×10⁵ ブラーク形成単位(pfu)/プレートの密度で150 mmプレート上において培養した。プレートを42℃で3.5時間インキュベートし、10 mM IPTG中で事前浸漬された乾燥ニトロセルロースフィルターで覆い、37℃で一夜インキュベートした。フィルターを取除き、0.05%ツイーン20(TBST)含有トリス緩衝液(TBS; pH 8.0の50 mM トリスHCl/150 mM NaCl)中の20%牛胎児血清で1時間ブロックし、しかる後相当時間にわたり適切な抗体と共にインキュベートした。抗体結合部位を(¹²⁵I)標識タンパク質Aで検出した。陽性ブラークを取出し、再プレート培養し、各クローンが純粋ブラークであると判明するまで再スクリーニングした。

交差スクリーニング実験のために、各ブラーク精製クロンのファージ溶解物1 µlを大腸菌Y

1090細胞区画にスポットした。組換え融合タンパク質を誘導し、ニトロセルロースに移し、下記のように免疫プロットした。様々な抗血清によるスクリーニング及び交差スクリーニングでは、第1表における5群のクローンを示した。免疫プロットに用いられたすべての抗血清をrgt11溶原BNN93の濃溶解物に完全に事前吸着させた。事前吸着後、それらをTBST中1:100希釈し、必要時まで4℃で貯蔵した。

組換えファージの各々に対する単一特異性抗体を、ホールらの方法(ネーチャー、第311巻、第379-382頁、1984年)の修正法により及び実施例2記載のようにウサギを実施例13記載の精製された組換えE. テネラCheY融合タンパク質で免疫することにより、実施例2の多特異性抗血清からアフィニティー精製した。融合タンパク質としては、A群のSO67-CheY; B群のSO7-CheY; C群のSP54-CheY; H群のSO311-CheY; 及びF群のSO216-CheYがあった。フィルターブランクリフトを

スクリーニングに用いられる精製組換えクローンから作成した。約 2×10^5 pfu を150mmプレート毎に培養して、37℃インキュベート時間の最後に半融合溶解状態に近づけた。次いで、ニトロセルロースを取除き、4時間にわたりTBST中20%牛胎児血清でブロックし、(0.02% NaN_3 含有TBST中20%牛胎児血清で1:200希釈された)事前吸着多特異性血清20mlと共に一夜インキュベートした。すべてのインキュベートを一定の攪拌下室温で行った。次いで、フィルターを各々20分間TBST50mlで5回及び0.15M NaCl/0.05%ツイーン20で1回洗浄した。抗体をpH2.8の0.2Mグリシン-HCl/0.15M NaCl/0.05%ツイーン20 10mlで30分間にわたり各々のフィルターから溶出させた。各溶出物のpHをトリス塩基で8.0に戻し、組換え溶出抗体(REA)を必要時まで-20℃で貯蔵した。

寄生虫抗原を、実施例1記載のプロテアーゼ阻害剤として1mMフェニルメチルスルホニルフルオ

リド(PMSF)含有のNET緩衝液(pH7.5の50mMトリスHCl、150mM NaCl、5mM EDTA)中で非孢子形成嚢胞体、孢子形成嚢胞体及びDE-52精製種虫を超音波処理することにより得た。各サンプルのタンパク質濃度を上記ローリーらの方法によって測定した。 3×10^5 非孢子形成/孢子形成嚢胞体からの抗原収量は約50 μ gであって、一方同量の抗原は約 2×10^6 種虫から得られた。サンプルを使用準備ができるまで-20℃に保持した。寄生虫抗原のプロットのために、各々の超音波処理サンプル50 μ gを等量の2 \times サンプル緩衝液(pH6.8の0.125MトリスHCl、4w/v% SDS、10w/v% 2-メルカプトエタノール、20%グリセロール及び0.0025%ブロモフェノールブルー)と混合し、3分間煮沸し、15%SDS-ポリアクリルアミドゲル又は5~20%SDS-ポリアクリルアミド勾配ゲル上のいずれかで電気泳動に付した(レムリ、ネーチャー、第227巻、第680-684頁、1970年)。

一方、プロテアーゼ阻害剤カクテル(1-10フェナントロリン2mg/ml、ベンズアミジン2mg/ml、PMSF0.002mg/ml、シグマ大豆トリプシン阻害剤0.048mg/ml、アプロチニン0.048mg/ml、ロイペプチン0.02mg/ml)含有NET緩衝液中に濃度 5×10^7 /mlの嚢胞体及び濃度 5×10^8 /mlの種虫を再懸濁させることにより抗原を得た。その時、サンプルをブロモフェノールブルーのない等量の2 \times サンプル緩衝液と混合し、サンプルを3分間煮沸し、完全に破壊されるまで超音波処理し、再度3分間再煮沸した。ブロモフェノールブルーを0.0025%まで加え、サンプルを使用準備ができるまで-20℃で貯蔵した。免疫プロットのために、嚢胞体又は種虫抗原をのせて、上記のような電気泳動に付した。

SDS-PAGEで分離されたタンパク質を、ドービンら、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンスUSA、第76巻、第4350-4354頁、1979年の

技術により電気泳動的にニトロセルロースに移動させた。次いで、ニトロセルロースを4時間TBS T中2.0%牛胎児血清でブロックした。ブロック後、ニトロセルロースを0.02% NaN_3 含有TBST中2.0%牛胎児血清で希釈された抗体20ml中において室温で一夜インキュベートした。多特異性抗血清は1:100~1:200希釈し、単一特異性組換え溶出抗血清は1:10希釈した。特異的抗体との接触後、フィルターをTBST 200mlで3回各々5分間にわたり洗浄した。結合抗体を最終濃度 2×10^5 カウント/min/mlまでTBST 20mlで希釈された ^{125}I -タンパク質Aにより検出した。放射線標識タンパク質Aとのインキュベートを室温で1時間行い、しかる後フィルターをTBST 200mlで3回5分間にわたり再度洗浄し、風乾し、コダックX-オマットAR (Kodak X-omat AR)フィルムに露出させた。

一方、ニトロセルロースを3回の200ml洗浄により1時間にわたりpH7.4のリン酸緩衝液中0.5%ゼラチンでブロックし、しかる後1時間に

わたりpH7.4の50mMトリスHCl、150mM NaCl、5mM EDTA含有TEN緩衝液中0.25%ゼラチンで二次ブロックし、前記のように洗浄した。ブロック後、ニトロセルロースを0.25%ゼラチン及び0.05%トリトンX-100含有TEN緩衝液で1:100~1:200希釈された抗体20ml中室温で一夜インキュベートした。フィルターを0.25%ゼラチン含有TEN 200mlで各々5回20分間にわたり洗浄した。結合抗体を最終濃度 2×10^5 cpm/mlまで0.25%ゼラチン、0.05%トリトン含有TEN 20mlで希釈された ^{125}I -タンパク質Aにより検出した。放射線標識タンパク質Aとのインキュベートを室温で1時間行い、しかる後フィルターを15分間にわたり0.25%ゼラチン、0.05%トリトン含有TEN 200mlで2回及び15分間にわたりTEN 200mlで4回洗浄した。洗浄後、フィルターを風乾し、コダックX-オマットARフィルムに露出させた。

実施例7

ファージDNAの調製

実施例6の組換え及び野性型rgt11ファージを多重度10で大腸菌宿主Y1089株(ヒューインら、前記)中に溶原として導入した。溶原を単一コロニー単離用としてアンピシリン100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有LBプレート上に画線的に接種し、30~32℃で一夜インキュベートした。いくつかのコロニーの増殖性を32℃及び42℃で調べた。42℃で増殖しなかった32℃プレート培養物から1つのコロニーを選別し、一夜の培養をアンピシリン50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有LBブイヨン中で行った。

次いで、溶原処理クローンを、0.3~0.5の600nm吸光度に達するまで、32℃でアンピシリン50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有LBブイヨン50ml中一夜培養物から増殖させた。ファージ切出し及び複製を20分間にわたる45℃への温度シフトによって誘導した。継続的ファージ複製は、細胞溶解の徴候が見えるまで、37℃で2~3時間培養物

を増殖させ続けることにより保証される。培養物が完全に溶解しない場合には、クロロホルム0.1mlを各々に加え、培養物を37℃で更に10分間攪拌した。これらの条件下、細胞の溶解は数分間後に生じる。この時点で、細胞破壊屑をベックマンJS-13ローター中7,000rpmで5分間の遠心分離によりルーチン的に除去した。ファージ上澄液を最終濃度0.01Mまでの MgSO_4 添加後4℃で一夜貯蔵し、ファージ頭部を溶解させた。

ファージ上澄液を室温に戻した後、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNアーゼI 50 μl 及び10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNアーゼA 25 μl を各サンプルに加えた。これらを30℃で最低1時間インキュベートし、しかる後NaCl 1.46gを加え、各々に完全に溶解させた。上澄液を最低30分間氷上で更にインキュベートした。次いで、残留細胞破壊屑をベックマンJS-13ローター中10,000rpmで10分間の遠心分離により集めた。上澄を各サンプルから集め、各上澄液にカルボワックス (Carbowax) PEG 8000 [ポリエチレングリコール2000、フ

ィッシャーサイエンティフィック社 (Fisher Scientific Co.)) 3.5 g を溶解させた。PEG 存在下、ファージ頭部を4℃で一夜放置して沈降させた。翌日、ファージ頭部を遠心分離により集めた。上澄液を4℃に維持されたベックマンJS-13ローター中10,000 rpm で10分間遠心分離した。上澄液を慎重に排出し、廃棄した。ペレットを0.1 M トリス-HCl (pH 7.9)、0.3 M NaCl 及び1 mM EDTA 250 µl に再懸濁し、しかる後0.5 M EDTA 12.5 µl を加えて、サンプル中に残留するすべての遊離Mg²⁺をキレート化させた。ファージ頭部を上記緩衝液中67℃で10分間インキュベートした。インキュベート後、10% SDS 5 µl を各サンプルに加え、サンプルを渦巻型ミキサー中で混合した。加熱して、ファージタンパク質を変性させた。SDSで変性工程を終了させ、ファージ頭部からDNAを放出させる。

次いで、ファージから放出されたDNAをフェノールで2回、クロロホルム-イソアミルアルコール

ール(24:1)で3回抽出し、1/10容量の3 M NaOAc(pH 7.5)及び2倍容量の無水エタノールの添加により沈降させた。サンプルを-20℃で一夜放置して沈降させた。翌日、DNAを小型遠心機で20分間の遠心分離により集めた。沈降DNAを0.3 M KOAc 300 µl に再溶解し、無水エタノール2倍容量の添加により再沈降させた。サンプルを-80℃で10分間インキュベートし、DNAを上記のような遠心分離によって集めた。DNAペレットを70%エタノールで洗浄し、乾燥し、10 mM トリス-HCl (pH 7.6)、1 mM EDTA (pH 8.0) 含有TE緩衝液100 µl に再懸濁した。各サンプル中におけるDNA濃度を波長260 nmでの分光測定により調べた。

実施例 8

rgt11クローンからのcDNAインサートの精製

実施例7のrgt11組換えファージ10~20 µg (最終DNA濃度0.2 µg/µl)を50 mM NaCl/100 mM トリスHCl (pH 7.5)/5 mM

MgCl₂ からのなる反応緩衝液中EcoRI (80 U/µl; ベーリンガー・マンハイム)で完全に切断した。反応を5倍過剰量の酵素を用いて37℃で4時間行った。反応生成物を3 M (pH 5.6) 貯蔵溶液1/10容量の添加によって0.3 M 酢酸ナトリウムに調節し、エタノール2.5倍容量で沈降させ、-70℃で20分間冷却し、4℃で15分間15,000 xgの遠心分離により集めた。ペレットをTE (pH 7.5の10 mM トリスHCl/0.1 mM EDTA) 30 µl に懸濁し、臭化エチジウム含有プレバレーティブ1%アガロース平面ゲル上においた。インサートを一夜の電気泳動(15 hr/60 mA)によりファージアームから分離した。

インサートの分別化を紫外線下での視覚化により確認した。アガロースゲルをcDNAインサートの両端でスライスし、NA-45膜片(シュレーチャー及びシュエル)をゲル中に挿入して、cDNAインサートを“サンドイッチ”(sandwiching)した。次いで、インサートをNA-45膜上で電気泳動に付した。終了後、膜をゲ

ルから取除き、小片に裁断し、50 mM アルギニン(遊離塩基)、1 M NaCl からのなる溶液250 µlと共にエッペンドルフ(Eppendorf)管に入れた。DNAを70℃で3時間かけて膜から溶出させ、水溶液を除去し、新鮮溶離液250 µlを用いて溶出プロセスを繰返した。2つの溶離液(全量500 µl)を合わせ、4℃に冷却した。不溶性粒子を4℃で10分間にわたる15,000 xgの遠心分離により集めた。次いで、可溶性物質をフェノールで2回、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(25:24:1)で2回及びクロロホルム/イソアミルアルコール(24:1)で2回抽出した。DNAを(上記のように)0.3 M 酢酸ナトリウム/EtOHで沈降させ、70% EtOHで2回洗浄し、風乾し、TE 25 µl に懸濁し、260 nmの吸光度から定量した。次いで、DNAの一部を確認のために分析用アガロースゲル上で分析した。

実施例 9

rgt11ライブラリーから単離されたcDNAク

ローンの地図作成

実施例8のDNAインサートを、A群(SO6'、SP1、SO67)、B群(SO9、SO24、SO7'、SO1')、C群(SP54、SP59)、H群(SO311、SO227、SO231)及びF群(SO216)の代表的ファージクローンから単離した。ファージインサートをベセスダ・リサーチ・ラボ市販のプラスミドベクターpUC18中に組込んでサブクロニングした。インサートの単離及びサブクロニングの双方を実施例12でCheYベクターpJC264に関して記載したように行った。プラスミドをLBブイヨン培養物5ml中ミニ調製物として増殖させ、実施例12記載のアルカリ溶菌法を用いてDNAを各々から単離した。10mMトリスHCl(pH8.0)、1mM EDTA(pH8.0)の無DNアーゼ臍臓RNアーゼ(20µg/ml)含有TE緩衝液50µl中簡単な渦巻式混合により再懸濁した。次いで、DNAサンプルを、cDNAインサートのカッター(cutter)又は非カッターであ

るか否かを調べるために、様々な制限エンドヌクレアーゼ(ベセスダ・リサーチ・ラボラトリーズを含む多くの業者から市販されている)で切断した。制限酵素切断は、常に製造者の指示に従い行われた。通常5種のカッターを各クローンについて選択し、地図作成分析を各組換えプラスミドの一重及び二重切断により行った。生じるDNAフラグメントを1%アガロースゲル上で電気泳動分離し、同一ゲル上で同時に操作されるDNAマーカーとの比較によりサイズ分けした。地図は、フラグメントサイズデータ及び公知のベクター制限部位をインテリジェネティクス制限地図作成プログラム(MAPインテリジェネティクス社)中に入れることにより、各クローンについて作成した。各場合において、すべてのデータと最も適合する地図は第1~5図に示されている。

実施例10

CheY-ANFプラスミドの作成

融合ポリペプチドSC1N-(ラットANF-26)用の発現プラスミドをpSCN1プラスミ

ドから得た。pSCN1プラスミドは酵母RAS1タンパク質SC1NのN末端165アミノ酸用の細菌発現プラスミドであって、テメルズら、ネチャー、第313巻、第700-703頁、1985年に記載されている。プラスミドpSC1N(1µg)をAccIで完全に切断し、末端を大腸菌DNAポリメラーゼI大フラグメント(クレノウポリメラーゼ)で補足した。合成ANF遺伝子をDdeI及びHincIIによるpANF-1切断によって切出した。クレノウポリメラーゼでDdeI末端を補足後、104bpフラグメントを単離した。次いで、ANF遺伝子フラグメントを上記のように処理されたpSC1Nに結合させ、コンピテントJM105細胞を形質転換させるために用いた。アンピシリン耐性コロニーを適切なオリゴヌクレオチドでスクリーニングした。ハイブリッド形成陽性コロニーのSDS抽出物を15%ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル(SDS-PAGE)上で電気泳動に付し、しかる後クマシーブルー染色又はタンパク質ブロット分析のいず

れかによって融合タンパク質の発現について調べた。

ANF遺伝子をpSCN1プラスミドからpLC1-28プラスミドに移した。プラスミドpLC1-28は完全Cheオペロンを含んだcolE1由来プラスミドであって、マツムラら、ジャーナル・オブ・バクテリオロジー、第160巻、第36-41頁、1985年に記載されている。CheY及びCDEZ遺伝子含有CheオペロンフラグメントをpLC1-28からBamHI-HindIIIフラグメントとして切出し、BamHI-HindIII切断pUC13(PLバイオケミカルズ)中に組込んでサブクロニングし、pUC13-CheY-CheZを得た。pUC13-CheY-CheZで形質転換された大腸菌JM105クローンは、pUC13ベクターの影響をうけたlacプロモーターによってCheY及びCheZポリペプチドを発現した。CheY-(ラットANF-26)融合用に発現プラスミドを作成するため、pUC13-CheY-CheZをCheYコード領域内部の唯一のPstI部

位及び挿入CheDNAの3'側のpUC13ポリリンカー中の唯一のSmaI部位において切断した。pUC13ベクター及びCheYのN末端100残基についてコードするDNAを含んだ、得られる3kb PstI-SmaIフラグメントをpSCN1-(ラットANF-26)の160bp PstI-HindIIIフラグメントと再結合させたが、これはMet-(ラットANF-26)についてコードしておりかつANFペプチドの末端コドンの3'側の非翻訳RAS1配列50bpを含んでいる。第6図参照。大腸菌JM105を上記2つのフラグメント含有結合混合体で形質転換させた。DNAをアンピシリン耐性クローンから(ミニ調製物として)単離した。所望のクローンはEcoRI-PstI切断で160bp遺伝子フラグメントを放出するものとして確認された。これらのクローンは、抗ANF抗血清を用いた全細胞タンパク質のウエスタンブロット分析によりANFペプチドを発現することが示された。

XhoI切断CheY-ANFと同時に移動するバンドとして確認された。このバンドを15、30、45及び60分間の切断に対応する各列からレーザー刃でゲルより切出し、65℃で溶融させ、37℃の0.2M NaCl、pH7.2の10mMトリスHCl、1mM EDTA(緩衝液A)10倍容量で希釈した。DNAを重力流(gravity flow)によりNACSプレバック(Prepac)カートリッジ(ベセスダ・リサーチ・ラボラトリーズ)BRLに結合させ、緩衝液A10mLで洗浄し、重力流により緩衝液D(2M NaCl、pH7.2の10mMトリスHCl、1mM EDTA)0.5mLで溶出させた。無水エタノール1mLをカラム溶出液に加えた。サンプルを混合し、ドライアイス上で10分間インキュベートし、4℃12,000 xgで15分間遠心分離した。上澄液をデカントし、沈降物を70%エタノール0.5mLで洗浄し、減圧乾燥した。TE(pH7.4の10mMトリス-HCl、1mM EDTA)中にベレットを溶解後、DNA含有量を臭化エチジウムスポット試験、即ちアガロースプレート法

実施例11

プラスミドpJC264の作成

実施例10からのCheY-ANFプラスミドをプラスミドpJC220に変換し、それを順々に修正して独特なpJC264プラスミドを作成した。CheY-ANFをpJC220に変換するため、CheY-ANFプラスミドDNA40μgを最終容量200μLのpH7.8の25mMトリスHCl、50mM NaCl、10mM MgCl₂、1mMジチオスレイトール及び100μg/mL牛血清アルブミン中HindIII(インターナショナル・バイオテクノロジー社)20単位と共に37℃でインキュベートした。15分間隔で、50μL部分をpH8.0の0.5M Na-EDTA2μL含有管に移して、切断を停止させた。各サンプル150ngを89mMトリス、89mMホウ酸、2mM EDTA(TBE)及び0.5μg/mL臭化エチジウム含有0.7%(w/v)シーブラークアガロース(FMC)ゲルの各隣接列において電気泳動に付した。直鎖化されたプラスミドは、365nm光で目視した場合に

により測定した(マニアティスら、分子クロニング:実験マニュアル、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、1982年、第468-469頁)。

直鎖プラスミドDNAの末端を、dATP、dGTP、dCTP及びTTP各20μM、60mM NaCl、pH7.5の6mMトリスHCl、6mM MgCl₂、1mMジチオスレイトール並びにDNAポリメラーゼI大(クレノウ)フラグメント22.5単位(ベーリンガー・マンハイム)含有反応混合物25μL中15℃で2時間30ngをインキュベートすることによりプラント化させた。反応を終了させ、DNAをフェノール/クロロホルム抽出(マニアティスら、前記、第458-459頁)及びエタノール沈降(マニアティスら、前記、第461頁)により精製した。

BamHIリンカー(d-GGGATCCC、ベーリンガー・マンハイム)12.5μgをpH7.4の50mMトリスHCl、10mM MgCl₂、5mMジチオスレイトール、500μM ATP及び40μCiのθ-

**P-ATP (アマーシム、5000 Ci/mmol、10 mCi/ml) 含有反応混合物 40 μ l 中 37℃ で 30 分間 T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (ファルマシア) 40 単位によりホスホリル化した。反応を、70℃ で 5 分間インキュベートすることにより停止させ、リンカーを使用時まで -20℃ で貯蔵した。

プラント末端化直鎖プラスミド DNA を水 6.6 μ l に溶解し、ホスホリル化 BamHI リンカー 125 ng、pH 7.5 の 6.6 mM トリス-HCl、6.6 mM MgCl₂、1 mM ATP、10 mM ジチオスレイトール及び T4 DNA リガーゼ (ニューイングランドバイオラブズ) 0.0025 単位含有最終容量 10 μ l に調節した。4℃ で 18 時間インキュベート後、この混合物 5 μ l をコンピテント大腸菌 HB 101 細胞 (BRL) 100 μ l に加えた。細胞の形質転換を BRL 発案法に従い行った。11 のアンピシリン耐性コロニーをランダムに選択し、各々をアンピシリン 100 μ g/ml 含有 LB ブイヨン (broth) 液体培地 (マニアティスら、前記)

DNA をエタノール 2 倍容量での沈降により回収した。次いで、HindIII 切断 DNA を dATP 及び dGTP 各 20 μ M、60 mM NaCl、pH 7.5 の 6 mM トリス-HCl、6 mM MgCl₂ 並びに 1 mM ジチオスレイトール含有溶液 20 μ l 中 DNA ポリメラーゼ I の大フラグメント (ベーリンガー-マンハイム)-5 単位で部分的に補足し、室温で 30 分間インキュベートした。サンプルをフェノール/クロロホルムで抽出し、マニアティスら、分子クローニング、実験マニュアル、コールド スプリングハーバー ラボラトリー、1982 年で記載のようにエタノール沈降によって回収した。

DNA を水に溶解し、最終容量 20 μ l 中 0.3 M NaCl、pH 4.6 の 30 mM 酢酸ナトリウム及び 4.5 mM ZnCl₂ に調節した。S1 スクレアーゼ (BRL) 5 単位を加え、混合物を 37℃ で 30 分間インキュベートした。切断を pH 8.0 の 0.5 M EDTA 1 μ g 添加によって停止させ、DNA をフェノール/クロロホルム抽出し、エタノール沈降させた。S1 スクレアーゼ処理 DNA を、100

5 ml に接種するために用いた。37℃ で一夜増殖後、プラスミドミニ調製物をアイシュ-ホロビクツ及びパーク、ヌクレック・アシッズリサーチ、第 9 巻、第 2989-2998 頁、1981 年 [Ish-Horowitz and Burke, Nucleic Acids Research 9:2989-2998 (1981)] で記載されているように作成した。

制限酵素地図作成及びアガロースゲル分析により、pJC220 と命名された 1 つのプラスミドはプロモーター隣接 HindIII 部位に BamHI リンカーを有していることが判明した。このプラスミドは、CheY コード領域の 3' 末端側に HindIII 部位 (今度は唯一) を保有していることも判明した。

pJC220 プラスミドを 50 mM NaCl、pH 7.4 の 10 mM トリス-HCl、10 mM MgSO₄ 及び 1 mM ジチオスレイトール含有溶液 50 μ l 中 37℃ で 1 時間にわたる HindIII (ベーリンガー-マンハイム) 50 単位での pJC220 DNA 10 μ g の切断によって pJC264 プラスミドに変換した。酢酸アンモニウムを最終濃度 2.5 M まで加え、

mM NaCl、pH 7.4 の 50 mM トリス-HCl 及び 10 mM MgSO₄ 含有緩衝液 50 μ l 中 37℃ で 30 分間 EcoRI (ニューイングランドバイオラブズ) 80 単位で切断した。DNA を上記のように酢酸アンモニウム中でのエタノール沈降によって回収した。

EcoRI 末端を上記のように、但し dATP 及び TTP の存在下かつ dGTP 及び dCTP の非存在下で DNA ポリメラーゼ I の大フラグメントにより補足した。DNA をフェノール/クロロホルムで抽出し、エタノール沈降により回収した。

この DNA 100 ng を pH 7.5 の 66 mM トリス-HCl、6.6 mM MgCl₂、10 mM ジチオスレイトール、1 mM ATP 及び T4 DNA リガーゼ (ニューイングランドバイオラブズ) 400 単位含有溶液 10 μ l 中 4℃ で 24 時間かけて結合させた。結合混合物 2 μ l を用いて、業者の標準操作法に従いコンピテント大腸菌 JM109 細胞 (ストラタジェン (Stratagen)) 100 μ l を形質転換させた。アンピシリン耐性形質転換株は、メーソン (Mason) 及びウィリアムズ (Williams)、"核酸

ハイブリッド形成：実務的アプローチ”、B. D. ハーメス (B. D. Hames) 及び S. J. ヒゲنز (S. J. Higgins) 編集、IRL プレス (1985 年) 第 113-137 頁の標準的方法を用い、プローブとして 5' -³²P- 標識合成オリゴヌクレオチド d (CCCAAGAATTCAGTGG) を用いてコロニーハイブリッド形成によりスクリーニングした。p J C 264 と命名された 1 つのハイブリッド形成コロニーは、制限地図作成によると、CheY 遺伝子の 3' 末端側に唯一の EcoRI 部位を再び組み入れていることが判明した。

CheY - A N F からの p J C 264 の作成法は第 7 図で略図化して示されており、p J C 264 の制限地図は第 8 図で示されている。

実施例 12

c DNA 挿入体の p J C 264 へのサブクローニング

実施例 11 で得られた p J C 264 20 μ g を実施例 8 で記載した反応条件を使用して EcoRI で直線状にした。反応生成物を沈澱させ 70 %

EtoH で 2 回洗浄し、蒸留水 43 μ l 及び 10 \times C I P 緩衝液 (0.5 M トリス-HCl、pH 9.0、10 mM MgCl₂、1 mM ZnCl₂、10 mM スペルミン) 5 μ l に懸濁させた。EcoRI 末端の 5' -リン酸基を仔ウシ腸アルカリ性ホスファターゼ (Boehringer-Mannheim) で除去した。酵素 (19 U/ μ l) 1 μ l を加え反応を 37 $^{\circ}$ C で 30 分間開始させた後 2 番目の 1 μ l を同じ時間加えた。蒸留水 42.5 μ l、20 % ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 2.5 μ l、10 \times STE (100 mM トリス-HCl、pH 8.0 / 1 M NaCl / 10 mM EDTA) 10 μ l を加えることにより反応を停止させ、68 $^{\circ}$ C で 15 分間加熱した。次いで反応混合液をフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (4:4:2) で 2 回、クロロホルム/イソアミルアルコール (2:4:1) で 2 回抽出し、最後に室温で 5 分間 1000 \times g で遠心分離により TE で平衡にしたセファデックス G-25 (媒質) の 1 cc カラム床に通過させた (スピノカラム)。次いで前述のように沈澱させ、70

% EtoH で 2 回洗浄し、TE 50 μ l に懸濁させ吸光度 260 nm で定量した。

p J C 264 を直線状にしホスファターゼ処理した EcoRI 約 100 ng をさらに 66 mM トリス-HCl、pH 7.6、5 mM MgCl₂、5 mM ジチオスレイトール、1 mM ATP からなる反応混合液 20 μ l 中で同モル量のゲル精製アイメリアテネラ c DNA 挿入体と混合した。T4 DNA リガーゼ (ニューイングランドバイオラプス、200 ~ 400 U/ μ l) を添加することにより反応を開始し、14 $^{\circ}$ C で 12 ~ 16 時間続けた。

予め決められた容量 (形質転換反応当り 3 μ l) の 2 X Y T 細菌培地 (1 μ l 当りバクトトリプトン 16 g / 酵母エキス 10 g / NaCl 5 g) を大腸菌 J M 83 の単一コロニーと温置し、600 nm に於ける光学密度 0.6 に達するまで 37 $^{\circ}$ C で激しく攪拌しながら増殖させた。細菌を 1000 \times g の遠心分離に 4 $^{\circ}$ C で 5 分間かけることにより集め、50 mM 滅菌 CaCl₂ を含む原培養の 1/2 容量に緩やかに懸濁させた。懸濁液を氷で 20 分間維持し、細菌

細胞を上述の通り遠心分離により集めた。次いで沈降物を 50 mM 滅菌 CaCl₂ の 1/10 容量に緩やかに懸濁させた。次いで細菌懸濁液を 4 $^{\circ}$ C で 16 ~ 24 時間維持した。

連結反応混合液 20 μ l を滅菌 TE 80 μ l を加えて、100 μ l に希釈し、5 μ l 及び 95 μ l アリコートポリプロピレン滅菌管に分配した。コンピテント細菌約 200 μ l を連結反応物 (並びに適当な連結及び形質転換対照) を含む各々の管に加え、40 分間氷上に置いた。その後 42 $^{\circ}$ C で 90 秒間温置して細菌を熱ショック処理した。次いでプラスミドを保護する細菌の選択及びプラスミド維持のために 50 μ g / l の濃度でアンピシリンを含む 2 X Y T 寒天平板に各々の形質転換反応管を覆った。平板を逆にして 37 $^{\circ}$ C で一晩温置した。

プラスミドを収容する細菌クローンを薬剤選択の存在下で平板の増殖能により同定した。2XYT / AMP (即ちアンピシリンを 50 μ g / l で含む 2 X Y T 培地) 5 μ l を接種するために単一コロ

ニーを使用し、これらの培養菌を37℃で一晩激しく振盪しながら増殖させた。培養菌約1.5mlをエッペンドルフ管に注ぎエッペンドルフ遠心機で少なくとも1分間遠心分離して集め、培養菌の残りを4℃で貯蔵し、遺伝子保存として使用した。細菌沈降物上の培地を吸引し、沈降物を50mMグルコース10mM EDTA、25mMトリス-HCl (pH8.0) 4ml、リゾチームの新しく調製した冷却溶液100μlに旋回させて懸濁させた。この混合液を室温で5分間温置した。次いで0.2N NaOH及び1%SDSからなる新しく調製した冷却溶液200μlを各々の管に加え、逆にして緩やかに混合し、氷に5分間置いた。この混合液に5M酢酸カリウム6ml、氷酢酸1.15ml、蒸留水2.85mlを含む新しく調製した冷却溶液150μlを加えた。内容物を渦巻き混合で緩やかに混合し、この混合液を氷で5分間貯蔵した。エッペンドルフ遠心機で4℃で10分間遠心分離することによって細胞片を集め、上澄み液をフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(25:

24:1)で1回抽出した。プラスミドDNA及び細胞性RNAを室温の100%エタノール2容量を加えた最終の水相から沈殿させた。沈降物を室温で5分間遠心分離して集め沈降物を70%エタノールで1回洗浄した後、簡単に乾燥した。次いで核酸沈降物を1ml当りDNase-遊離RNase20μgを含むTE50μlに懸濁させ、37℃で15~30分間温置して細胞性RNAを量的除去した。次いで10μlのアリコートで50mM NaCl、100mMトリス-HCl (pH7.5)、5mM MgCl₂からなる緩衝液中37℃60分間EcoRI(約20ユニット)で完全に切断した。制限酵素反応生成物をアガロースゲル電気泳動によって分画して適当な挿入体を含むプラスミドを同定した。次いで、予測したEcoRI挿入体を含む組換え体プラスミドを第2制限酵素(通常PstI)で切断して(i)挿入体の単一複写のみがプラスミド内に含まれることが実証され(ii)細菌プロモーターに関して挿入体DNAの配向が記録された。これは、RNase-消化された細菌核酸の残りの40

μlから2番目の10μlアリコートを除去し、PstI約20ユニットを含む100mM NaCl、10mMトリス-HCl (pH7.5)及び10mM MgCl₂からなる緩衝液中37℃で60分間切断した。制限酵素消化物をアガロースゲル電気泳動によって分解した。

実施例13

アイメリア-CheY融合タンパク質の産生

ブイヨン5mlに細菌の単一コロニーを接種して選択組換え体細菌の一夜培養を調製した。培地はアンピシリン(50μg/ml)を含む2XYT(1l当りトリプトン16g、酵母エキス10g、NaCl10g)であった。アンピシリンを含む2XYT500mlを接種するために一夜培養を使用した。培養を37℃で通気しながら中間対数増殖が(A550~0.5)に達するまで増殖させ、この点でIPTGを最終濃度100μMまで加えた。培養を37℃で更に3~4時間増殖させ氷で冷却し、4℃で15分間遠心分離した。細胞をPBSで1回洗浄した後細菌を遠心分離で集め、

必要になるまで-70℃で凍結貯蔵した。必要とした際細菌沈降物を解凍し、30mMトリス-HCl、pH8.0、50mM EDTA及び1mMフェニルメチルスルホニルフルオリド(緩衝液A)10mlに懸濁させた。懸濁液を氷上でブランソンセルディスラプターモデル350(デューティサイクル30、出力コントロール4)を使用して各回3分間で2回超音波処理した。超音波処理物を27000xgで45分間4℃で遠心分離して清澄化した。上澄み液は第1上澄み液を構成した。不溶性物質の沈降物を0.1%w/vトリトンX100を含む緩衝液A10mlで洗浄した。懸濁液を氷浴中で30分間攪拌した後27,000xgで45分間4℃で遠心分離した。上澄み液は第2上澄み液と呼ばれる。次いで沈降物(P₂)を緩衝液Aで2回洗浄し、洗液を捨てた。沈降物(P₂)を100mMジチオスレイトールを含む6Mグアニジン-HCl1.0mlに懸濁させ、懸濁液を50℃で2時間温置した。懸濁液を7M尿素で10mlに希釈し、27,000xgで45分間4℃で遠心分離して清澄化した。上澄み液は

第3上澄み液を構成した。異種融合タンパク質は異なった溶解度特性を示し、主に第1上澄み液に見い出され、そして第2上澄み液及び第3上澄み液に（最も共通的に）見い出された。

SO6-CheY抗原（組換え体A抗原）は第1、第2及び第3上澄み液で見い出された。生体内試験に対する物質はイオン交換クロマトグラフィによって第3上澄み液から調製された。0.025M トリス-HCl、pH 8.5、8M尿素で平衡にしたトリシアクリルM-DEAE（LKB）カラム（5ml）を調製した。第3上澄み液からタンパク質12mgを含む2ml試料を上記緩衝液100mlに対して透析した後カラムに適用した。カラムをカラム緩衝液の1カラム容量で洗浄した後、0.05M、0.1M、0.15M、0.2M、0.25M、0.3M、0.35M又は0.4M NaClを含むカラム緩衝液で段階的に溶離した。各々の溶離を2カラム容量で行なった。溶出液をウサギ抗フラクシオンVを使用してSDS-PAGE及びウエスタンブロットティングにより組換え体タンパク質の存在を

試験した。SO6/CheYタンパク質が0.15M及び0.20M NaCl画分に溶離することを見い出した。画分をブールし、50mM NH_4CO_3 に対して透析し、凍結乾燥した。500ml培養からの蛋白質の収量は約3mgである。

SO7-CheY融合タンパク質（組換え体B抗原）は第3上澄み液に見い出された。更に水酸化リン灰石によるクロマトグラフィで精製した。水酸化リン灰石（床容量6ml、バイオラドラブス、HPTグレード）を7M尿素で平衡にし、第3上澄み液をカラムに適用した。カラムを7M尿素的1床容量で洗浄した後、流動液及び洗液を合わせ、アミコン透過膜YM10で10mlに濃縮し、50mM NH_4HCO_3 に対して透析し、凍結乾燥した（生成したいかなる沈降物も包含する）。500ml培養からの収量は約35mgタンパク質であった。

またSP54-CheY融合タンパク質（組換え体C抗原）は第3上澄み液に見い出された。インビボ試験用には、更に精製する必要はなかった。500ml培養からの第3上澄み液中のタンパク

質の収量は約170mgであった。

SO311-CheY融合タンパク質（組換え体H抗原）もまた第3上澄み液中に見い出された。更に水酸化リン灰石によるクロマトグラフィで精製された。カラムを上述の通り調製し、第3上澄み液を適用した。カラムを7M尿素的2床容量、次に10mM、20mM、40mM、80mM、160mM又は320mMリン酸ナトリウム緩衝液pH 6.5を含む7M尿素的2床容量で展開した。カラム溶出液をウサギ抗フラクシオンV、ウサギ抗スポロゾイト血清又は組換え体溶離抗体を使用してSDS-PAGE及びウエスタンブロットティングにより組換え体タンパク質の存在に対して試験した。SO311-29-CheYタンパク質が40mM、80mM及び160mM溶出液に見い出された。これらの溶出液を上述の通り正確にブールし、濃縮し、透析し、凍結乾燥した。500ml培養液からの収量は約5mgタンパク質であった。

またSO216-CheY融合タンパク質（組換え体F抗原）が第3上澄み液に見い出された。生

体内試験に対して精製は必要としなかった。500ml培養液からの収量は約30mgタンパク質であった。

実施例14

組換え体E、テネラ由来免疫原の特徴付け

実施例9で得られた代表的なE、テネラ免疫原クローンを3標準方法の1又は2を利用してスクレオチド配列分析にかけた。いくつかの配列分析はマクサム及びギルバート、メソッズ、イン、エンザイモロジー、第65巻（1部）497～559頁（1980年）の化学的滅成（degradation）方法を使用して決定される。更に一般的にはハットリ及びサカキ、Analyt. Biochem. 第152巻、232～238頁（1986年）に記載される変性プラスミド鋳型（E、テネラcDNAの同類配列を含むプラスミドpUC18）を使用するジデオキシ鎖終結技術により決定される。スクレオチド配列決定の第3方法はメッシング、メソッズ、イン、エンザイモロジー、第101巻、20～78頁（1983年）のジデオキシ鎖終結配列標準方

法を使用する cDNA 挿入体又はその一部をバクテリオファージ mp18 にサブクローンし、分泌-重鎖組換え体ファージ鑄型を配列することによって達成される。更に AMV 逆転写及び DNA ポリメラーゼ I、変性 T7 DNA ポリメラーゼのクレノウフラグメントが使用される、タボー及びリチャードソン、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 第 84 巻、4767~4771 頁 (1987 年) 参照。

アミノ酸配列は以下の情報を組合わせることにより、決定ヌクレオチド配列から推定された。ファージ発現ベクター λ gt μ 中 cDNA、実施例 8 参照の各々は β -ガラクトシダーゼで融合タンパク質として発現された場合ポリクローナル抗血清、実施例 2 参照によって同定された。この融合タンパク質の共有付加の性質を次の表に示す。

表 5	
EcoRI クローニング部位	
EcoRI	
β -ガラクトシダーゼ	E. テネラ
5'	3'
	GCG GAA TTC
	Ala Glu Phe

EcoRI 開裂部位に於けるこの結合 (及び読取り枠、クローニング部位) は、サブクローニングベクター pUC18 mp18 又は pJC264 に関係なく、全 cDNA を含んでいる次の各々のクローニングで再生される。従って読取り枠は明白に同定されこれらの 3 種のベクター中の挿入体の配向が確立されればヌクレオチド配列が翻訳される。プラスミド、pUC18 及び pJC264 又はファージ mp18、ベクター中の cDNA 挿入体の配

向は制限酵素マッピングにより達成される。実施例 9 参照、非対称制限酵素認識配列が cDNA 挿入体内に同定されれば挿入体配向及び転写配向は認識配列がヌクレオチド配列によって同様に予測される場合明白に指定することができる。

A 型クローンヌクレオチド配列及び得られた A 型免疫原アミノ酸配列は代表的なクローン S067 で例示される。このクローンは S06 クローン内に完全に含まれる実施例 9 参照。このクローンには約 870 ヌクレオチドのうち 5' 末端で開始する最初の 162 ヌクレオチドが配列されている。転写配向、従って正確な読取り枠は、CheY-S067 組換え体プラスミドの制限酵素マッピングによって予測される制限酵素認識配列のヌクレオチド配列中の位置に基づいて明白に推定することができる。ヌクレオチド配列及び得られた 53 N-末端アミノ酸配列を以下の表に示す。

表 6	
A 型免疫原 S067 の N-末端ヌクレオチド及び推定アミノ酸配列	
10	20
30	40
50	
TTA TTC CTT CGA TGC CTG GCG GCG TTG TTC ATC ATG TTC ATC ACC AGG CGC CTT CTG	
Leu Phe Leu Arg Cys Leu Ala Ala Leu Phe Ile Met Phe Ile Thr Arg Arg Leu Leu	
10	
60	70
80	90
100	110
CTG CTG CGA TTC ACC GTT CCT ACC GTG CTT TGC TGC TGC AGC AGC AGC ANG TGC TCG	
Leu Leu Arg Phe Thr Val Pro Thr Val Leu Cys Cys Cys Ser Ser Ser XXX Cys Ser	
20	30
120	130
140	150
160	
TCG ANG NAG AGC GCC GCG GCA GCA GAA GCA GCA GCA GCA GCT CG	
Ser XXX XXX Ser Ala Gly Ala Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala	
40	50

更に221ヌクレオチド配列はクローンの3'末端から得られる、以下の表7参照が読取り枠は推定されていない。

表7

A型免疫原SO67の3'ヌクレオチド配列

1 CGAGTGGCTG GTTGACACCG GCAGGGTCTT CGCCGGCGGC GTTGCTAGCA TAGCCGACGG
61 CTGCCGGCTC TTCGGAGCAG CAGTGGAGGG CGAGGGCAAC GCTGGGAAGA ACTCGTCAAG
121 ACCAACTACC AAATTGAAGT CCCCAGGAA GACGGAACCT CCATTTCAGT GGATTGGCAG
181 GAGGGCGAGA CTCGCGGCA GCGGTGGTG GACGGCGCG C

B型クローンヌクレオチド配列及び得られたB型免疫原アミノ酸配列は、代表的なクローンSO7で例示される。読取り枠はヌクレオチド配列分析により予想される通り。DNA内に非対称に位置する制限酵素部位の位置を各々の認識配列の位置と関係付けることによって明白に推定することができる。このクローンには957ヌクレオチド全てが配列されている。ヌクレオチド配列と塩基713に於ける終止コドンまでのアミノ酸配列を以下の表に示す。

表8

B型免疫原SO7のヌクレオチド及び推定アミノ酸配列

10	20	30	40	50	
T CTC GCC CCA ACT TTT TCC CCC GCG CTC CGC AGC AGC AGC AGC AGC AGC AGC AGC	*	*	*	*	*
Leu Ala Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Arg Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser					
60	70	80	90	100	110
*	*	*	*	*	*
AGC AAA ATG GCA GAC CTC TTC AGC GGA CTC GTG GCG GCG CTC GTC GGC GCT GTT GCT					
Ser Lys Met Ala Asp Leu Phe Ser Gly Leu Val Gly Val Gly Val Gly Ala Val Ala					
20	30				
120	130	140	150	160	170
*	*	*	*	*	*
GCA GCA GAT TTG CCT GCG GAG GCG GAG AGG GCC CGC CGC CGC CGC CGC CGC CGC ACT GCC					
Ala Ala Asp Leu Pro Ala Glu Gly Glu Arg Ala Pro Arg Pro Ala Pro Gly Thr Ala					
40	50				
180	190	200	210	220	
*	*	*	*	*	*
TGG ACT TGC TGC AGC AAA CTG CAA GAA GCG GCC CGC GAG CTG GAG GGT TTT GTG					
Trp Thr Cys Cys Ser Lys Leu Glu Gly Ala Arg Glu Leu Glu Gly Phe Val					
60	70				
230	240	250	260	270	280
*	*	*	*	*	*
CAG CAG CTC AGT TTT GTT GCA GGG AAG CTG GCG TGC TGC CTG GCG GCG GCG GAG					
Gln Gln Leu Ser Phe Val Ala Gly Lys Leu Ala Cys Cys Leu Arg Val Gly Ala Glu					
80	90				

表 8 (続き)

580	590	600	610	620	
TTC CTG GCG GGC TAC CAG GGG GCA GCA GCG GGG AGG TCT CTG GGC TAC GGG GCC CCT					
Phe Leu Arg Gly Tyr Gln Gly Ala Ala Ala Gly Arg Ser Leu Gly Tyr Gly Ala Pro					
200					
630	640	650	660	670	680
GCT GCT GCT TAC GGC CAG CAG CAG CCC AGC AGC TAC GGG GGC CCC CCC GCC TCC					
Ala Ala Ala Tyr Gly Gln Gln Gln Pro Ser Tyr Gly Ala Pro Pro Ala Ser					
210	220				
690	700	710	720	730	740
AGC CAG CAG CCC TCC GGC TTC TTC TGG TAG CCC TGC AGC AGC AGC AGC AGC AGC					
Ser Gln Gln Pro Ser Gly Phe Phe Trp					
230					
750	760	770	780	790	
AGC AGC AGC AGC GCG GGC GGC AGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC CAA CAG					
800	810	820	830	840	850
CAG CAG CCG GGC CTA GCG CCG CCG AGC ACT CCG AGC GAA CTC CAC AGC CAG CCG					
860	870	880	890	900	910
GAG AGC AGC AGC GAC GAG GAG CAG GTC ATG TAG CCG AGG CAG CAG CCG CAG CTG CAG					
920	930	940	950		
CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG					

表 8 (続き)

290	300	310	320	330	340
CAG CTG GCG GCG TGC GCT GCG CAG GCG GCG CTG CCC AGC AGC AGC AGC AGC AGC					
Gln Leu Ala Ala Arg Cys Ala Ala Ala Gly Arg Leu Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser					
100					
350	360	370	380	390	400
TGC TGC GCG CTG CTG CAG CTC CAG AGC CAG GAC CTC GAG CAG AGC CTC GAG GCC GGC					
Cys Cys Ala Leu Leu Gln Leu Gln Lys Gln Asp Leu Glu Ser Leu Glu Ala Gly					
120					
410	420	430	440	450	
AGC CAG GCG GCG GAG TGC CTC TTG AGG AGC AGC AAA CTG GCC CTC GAG GCC CTC CTC					
Lys Gln Gly Ala Glu Cys Leu Leu Arg Ser Ser Lys Leu Ala Leu Glu Ala Leu Leu					
140					
460	470	480	490	500	510
GAG GGG GCC GCG GTT GCA GCA ACC GCG GGT TTG CTG CTG GTC GAG AGC AGC AAA GAC					
Glu Gly Ala Arg Val Ala Ala Thr Arg Gly Leu Leu Val Glu Ser Ser Lys Asp					
160					
520	530	540	550	560	570
ACC GTG CTG CCG AGC ATT CCC CAC ACC CAG GAG AAG CTG GCC CAG GCC TAC AGT TCT					
Thr Val Leu Arg Ser Ile Pro His Thr Gln Glu Lys Leu Ala Gln Ala Yyr Ser Ser					
180					

C型クローンヌクレオチド配列及び得られたC型免疫原アミノ酸配列は、代表的なクローンSP54で例示される、実施例9参照。このクローンはSP59クローン内に完全に含まれる、実施例9参照。このクローンには約700ヌクレオチドのうち5'末端で開始する最初の157ヌクレオチドが配列されている。転写配向従って適当な読取り枠はヌクレオチド配列中の制限酵素認識配列をCheY-SP54組換えプラスミドの制限酵素マッピングによって予測される非対称位置と関係づけることによって明白に推定することができる。ヌクレオチド配列及び得られた52個のアミノ酸配列を以下の表に示す。

表 9
C型免疫原SP54のN-末端ヌクレオチド及び推定アミノ酸配列

10	20	30	40	50
* C GCG GAA TCC GCA GAC ACT GCT GAG ATC CGC GTG CCC GTG GGG GCC ACT GTG GTG GTG	* Ala Glu Ser Ala Asp Thr Ala Glu Ile Arg Val Pro Val Gly Ala Thr Val Val Val	* 10	* 60	* 70
* CGG CTT CAG AGC GTT GGG GGC TAC AGG CCA GTG TTG GTG AGT GCC CAG AGT GGG GCT	* Arg Leu Gln Ser Val Gly Gly Tyr Arg Pro Val Leu Val Ser Ala Gln Ser Gly Ala	* 80	* 90	* 100
* 20	* 30	* 120	* 130	* 140
* GTG GGC CTC TCC GAG CTT TCC CAG GCT TCC CCC AGT TCG GCC	* Val Gly Leu Ser Glu Leu Ser Gln Ala Ser Pro Ser Ser Ala	* 40	* 50	* 150

H型クローンヌクレオチド配列及び得られたH型免疫原アミノ酸配列は、代表的なクローンSO311によって例示される、実施例9参照。このクローンにおいて約650ヌクレオチドの中の5'末端で始まっている最初の185ヌクレオチドが配列されていた。転写配向従って適当な読取り枠はヌクレオチド配列中の制限認識配列を制限酵素マッピングにより予測される非対称位置と関係づけることによって明白に推定することができる。ヌクレオチド配列及び得られた61アミノ酸配列を以下の表に示す。

表 10
H型免疫原SO311のN-末端ヌクレオチド及び推定アミノ酸配列

10	20	30	40	50
* C CTG GCC ACA GGG CTC CTG TTC GCC AAC AGC CTG CTG CGA CAT GGA TCT GTC AGA GTG	* Leu Ala Thr Gly Leu Leu Phe Ala Asn Ser Leu Leu Arg His Gly Ser Val Arg Val	* 10	* 60	* 70
* GCA CAT TGT GAA TGC AAT TCT GTG CGG GTC TCT TGC GGC CGC TGC TCA CTT CGC CAC	* Ala His Cys Gly Cys Asn Ser Val Arg Val Ser Cys Gly Arg Cys Ser Leu Arg His	* 80	* 90	* 100
* 20	* 30	* 120	* 130	* 140
* GAA AGT CAA CCC CAG GGC TAT GCA AGC TGG ATT CAG AGT ATA CAA GGC CGA AAC TTC	* Glu Ser Gln Pro Gln Gly Tyr Ala Ser Trp Ile Gln Ser Ile Gln Gly Arg Asn Phe	* 40	* 50	* 150

180

AAT GCG CGA GCT C

Asn Ala Arg Ala

60

さらに、クローンの3'末端から283ヌクレオチド配列が得られた。下記表を参照のこと。ただし、読取り枠は誘導されていない。リンカーヌクレオチドは1～8位に含まれている。

表 1.1

H型免疫原S0311の3'末端ヌクレオチド配列

1 GAATTCGGGT TATCCACATC ACGGTGGACG TCTGATTAG CGGAGGAGGT ATGAACCTC
61 AGAGCCAGCC CAGTAGGAAG CATTATCCA TCTTGGTCTT TGCTCCACA GACGGTGCAG
121 GATTTCCAGG AGAGAGTGA TCATTCTCT CAGTGTGGG ATGACATTCT CAGATGCGG
181 CATCACGTAA TGATAGCCAT TCGTGTCCA GTGGGAAGCT ATGCTCTGAC TCTGGAGAGC
241 ACCATTTCGG CGTGATACTT GAGCTTGTC GAGATAGCCA GCTGCTTCGA G

免疫原A、B、C及びHに特異的なmRNAによって生じた試験管内一次翻訳生産物の分子量を定量した。胞子形成されないオオシスト胞子形成オオシスト及びスポロゾイトから抽出されたmRNAの試験管内翻訳はウサギ網状赤血球細胞を含まない翻訳系を使用し、結合指示同位元素として³⁵S-メチオニン或は³H-ロイシンを用いて行なった。特異的試験管内翻訳生産物は実施例6で記載した通り調製した単一特異性抗体を使用して免疫沈澱させた。試験管内翻訳に対するプロトコールはプロメガバイオテック（製造者の指導による）の技術報告に記載される通りであり免疫沈澱に対するプロトコールはテイラー等、Mol. Biochem. Parasitol. 第10巻、305～318頁（1983年）の通りである。単一特異性抗体によって認識されたA型一次翻訳生産物は、分子量24キロドルトン(kD)を有する。クローンS07からの優位量のB型免疫原は分子量28kDを有し、一方劣量の免疫原は分子量170、24、22、16及び12kDを有する。更に劣量の特異的に免疫沈澱可

F型免疫原のF型クローンヌクレオチド配列は代表的なクローンS0216によって例示される、実施例9参照。各末端に8個のリンカーヌクレオチドを含む約487ヌクレオチドを配列している。配列を以下の表に示す。

表 1.2

F型免疫原S0216のヌクレオチド配列

1 GAATTCGGGC AGAAAACAAT TACTGAAAGA CGGAGGGAAA GTGTCTCGCC GCCAAGTTA
61 AGCGAACGGA CTGATTGGGA AATAGGGTCT TGCTCGCAA ACGAATGCTG CAAATGCATC
121 CCAAGCGGT ACCCGGATGG ATCAGCAAGA AAAACNCCTC AGTGAACGA TAGGAGCTGA
181 TGCCGAAGTC CGCACAGCAT GATCTATGTC TCATCGCTGC TCAGTTAGCT ACTGAGGCCA
241 CACGGAAGGA GTGCTTTAGT TGTAGTTCTT GAGGTCTTCT ACGTGTACGG CATAGTCGAT
301 GCTAGGGAAA CGAACAAGAG GGGCACCAGG TGACGACTCG TCGATGTCAG CATGGAAGCC
361 AGCAGCCGCC AGGACAGGCG TCAAGGCAAC GAGTGGGACT AAAGCTTCAA TGGCGCTGTC
421 TTTGCTGACT TTGAGATCC AGGAGGTCTC GGCAGACTCG CTGACGGACT GGAGCAGCTC
481 CGAATTC

能な試験管内翻訳生産物は、³H-ロイシンを標識前駆体アミノ酸として使用した場合、検出することができた。また170kDと22kDの劣量の免疫原も³⁵S-メチオニンで検出することができた。優位量の28kD免疫原は、³H-ロイシンを前駆体アミノ酸として使用した場合のみ検出することができた。C型免疫原に対する分子量は測定されなかった。クローンS0311からの優位量のH型免疫原は分子量28kDを有し、一方、劣量の免疫原は分子量48、38、33、16、13、12、10kDを有する。更に劣量の特異的に免疫沈澱可能な試験管内翻訳生産物は³⁵S-メチオニンを標識前駆体アミノ酸として使用した場合に検出することができた。優位量の28kD免疫原は³⁵S-メチオニン及び³H-ロイシンの両方を使用した場合に検出することができた。

実施例5のE. テネラの非胞子形成及び胞子形成オオシスト及び／又はスポロゾイトから抽出された特異的mRNAはマニアチス等、モレキュラー クローニング ラボラトリー マニュアル、

コールドスプリングハーバーラボラトリー、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク、202頁(1982年)の方法によるノザンブロット法(Northern blot analysis)及びSchleicher及びSchuell社16~19頁(1987年)によって発表されたトランスファ アンド イムノビリゼーション オブ スクレイック アシッズ トゥ S & S ソリッド サポートに記載された方法によって分類した。A型クローンS067に相補的なmRNAは、 2.15 ± 0.13 キロベース(kb)であり、B型クローンS07には 1.23 ± 0.22 kbであり、C型クローンSP54及びSP59には 1.12 ± 0.08 kbであり、そしてH型クローンS0311には 0.98 ± 0.07 kbであった。

またE. テネラ免疫原の分子量及び等電点を測定した。分子量はE. テネラの胞子形成オオシスト及び/又はスポロゾイトから調製した試料の分析用ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)した後、実施例6で記載した通りニトロセルロースに移し、

そして実施例6で記載した通りのウエスタンブロットティングによる免疫検出によって定量した。等電点は上述した試料の2次元ゲルのウエスタンブロットティングにより測定した。次元ゲルはO'Farrell, J. Biol. Chem. 第250巻、4007~4021頁(1975年)の操作によって行なった。両方の操作に対する抗体は、実施例2及び6で述べた通り調製した。結果を以下の表に示す。

表 13

天然のE. テネラ免疫原の分子量及び等電点

免疫原型	代表的クローン	分子量(kD)	等電点
A	S06, S067	24	3.65
B	S07	27-28 22, 19, 18, 14, 12, 9, 6	5.1-6.3
C	SP54, SP59	21-22	n.d.
H	S0311	28, 18 27, 24, 23, 17, 14, 12, 9	6.65
F	S0216	26-29	n.d.

優勢なB免疫原は、SDS-PAGE上に27~28kDの拡散二重線として特徴を表わし、劣勢な免疫原はE. テネラ内の抗原決定基が分割していると思われる弱いバンドとして現われる。27~28の二重線はpH5.1~6.3の範囲で等電集束により多重スポットを生じる。更にウエスタンブロットティングにより検出された微弱バンドの

pIは測定されなかった。

実施例15

組換え体由来E. テネラ免疫原によるE. テネラでの攻撃に対する防御誘発

ブロイラー用ひな鶏にミョウバンに吸収させたリン酸塩緩衝食塩水中実施例13で得た特異的組換え体融合免疫原10 μ gを含む試料、最終濃度0.4%を1羽当たり1投与量につき全量0.12mlで生後2、9、16日目に筋肉内経路により3回免疫した。免疫原-ミョウバン複合体はウェイル、ハンドブットオブ イクスベリメンタル イムノロジー、ブラックウェルサイエンティフィックパブリケーションズ ロンドン A3.11頁(1978年)の操作により調製した。実験用及び対照用の鶏を、最終免疫の7日後の23日目に、生後30日に非免疫対照に少なくとも2.5の平均病変スコアを生じるのに十分な量を5~30 $\times 10^3$ の胞子形成オオシストの経口接種で攻撃した。攻撃の7日後鶏を殺し、盲腸の病変の重篤度をジョンソン及びレイド、Exp. Parasitol第28

巻30～36頁(1970年)の方法により決定した。代表例の結果を表14～18に示す。

表 1 7

A型免疫原S067-CheYを用いたコクシジウム症に
鶏の対する防御

攻撃投与量 ($\times 10^{-3}$)	免疫感染	非免疫感染
5	2.18	3.41
10	2.57	3.57
15	1.78	3.44

表 1 4

B型免疫原S07-CheYを用いたコクシジウム症に
対する鶏の防御

攻撃投与量 ($\times 10^{-3}$)	免疫感染	非免疫感染
10	1.41	3.00
20	1.28	3.43
30	1.34	3.38

表 1 5

C型免疫原SP54-CheYを用いたコクシジウム症に
対する鶏の防御

攻撃投与量 ($\times 10^{-3}$)	免疫感染	非免疫感染
5	1.71	3.38
10	1.68	3.00
15	1.93	3.22

表 1 6

H型免疫原S0311-CheYを用いたコクシジウム症に
対する鶏の防御

攻撃投与量 ($\times 10^{-3}$)	免疫感染	非免疫感染
10	2.03	2.97
15	2.00	3.32

表 1 8

F型免疫原S0216-CheYを用いたコクシジウム症に
対する鶏の防御

攻撃投与量 ($\times 10^{-3}$)	免疫感染	非免疫感染
10	1.50	2.16
15	1.30	2.72
20	1.25	2.89

これらの結果は、組換え体E、テネラ免疫原A、B、C、H及びFが生後2日の鶏をコクシジウム症に対して免疫にするために使用することができることを示す。3回の筋肉内接種は標準的ビルレント感染後免疫鶏に重篤な病変が現われないことによって示されるように疾病に対して高レベルの防御を与える。

実施例 1 6

アイメリアテネラ由来B免疫原の天然形態の分離

0.1 mMフェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)を含むリン酸塩緩衝生理的食塩水(PBS) 20 ml中E、テネラの 1×10^8 胞子形成オオシストの懸濁液をブランソン ソニック パワー社のソニフィア セル ディスラプター350(デューティサイクル30%出力コントロール4)を使用する2.5分破裂で合計10分間氷浴中で超音波処理した。超音波処理物を4℃で30分間27,000xgで遠心分離した。ペレットを40 ml PBS/0.1 mM PMSFで3回洗浄し、上述の通り遠心分離して回収した。洗浄したペレ

ットを60mlの5Mグアニジン-HCl / 0.5M トリス-HCl、pH 8.6及びジチオスレイトール 400mgに再懸濁させた。20℃で3時間緩やかに攪拌しながら還元を進行させておいた。不溶性破片を上述の通り遠心分離で除去した。還元及び可溶化B抗原を含む上澄み液を限外濾過（ウルトラフィルターPM-10、アミコン社）によって20mlに濃縮しヨード酢酸（400mg）を加えた。3Mトリス塩基を加えてpH 8.6に再調節し、20℃で60分間暗所でカルボキシメチル化を進行させてた。次いで反応混合液を0.05M NH_4HCO_3 / 0.1mM PMSF / 0.02%アジ化ナトリウムに対して48時間透析した。グアニジン-HClを除去していくらかの不溶性物質が生成し、その後上述の通り遠心分離により除去した。次いで透明な上澄み液を上述の通り限外濾過により12mlまで濃縮した。次いで濃縮物を0.05M NH_4HCO_3 、0.1%ツイッタージェント（Zwittergent）3-12（Calbiochem）、0.02%アジ化ナトリウムで平衡させたセファクリル（Sephacryl）S-200の

肉内経路により3回免疫した。免疫原-ミョウバン複合体をウェイル、バンドブック オブ イク スペリメンタル イムノロジー、ブラックウェル サイエントフィック パブリケーション、ロンドン、A3-11頁（1978年）の操作により調製した。実験用及び対照用鶏を最終免疫の7日後の23日目に、 $5 \sim 15 \times 10^3$ 胞子形成オオシストの経口接種で攻撃した。攻撃7日後、鶏を殺し、盲腸の病変の重篤度をジョンソン及びレイド、Exp. Parasitol第28巻、30～36頁（1970年）の方法に従って決定した。結果は8羽群に対する平均盲腸病変スコアとして表わし、以下の表に示す。

定寸のカラム（87×2.5cm）に適用した。流速25ml / 時間で合計120×4.5ml画分を集めた。流出液画分を280nmでモニターし、B免疫原の溶離を始めにウサギ抗スポロゾイト抗血清次にSO7 / CheYタンパク質に対するウサギ抗血清を使用するウエスタンブロッティングによりモニターした。B抗原を含む画分（47～57）をプールし10mlに濃縮し、再びカラムに適用した。カラムを溶離し、前述のようにモニターした。プールした画分を約0.5mgタンパク質/mlを含む容量に濃縮した。全収量は5.8mgであった。

SDSゲル分析は30kD±3kDの単一の均質に純粋なタンパク質であり、ウエスタンブロット分析によりウサギ抗スポロゾイト抗血清及びウサギ抗-SO7-CheYの両方と反応性であった。

E. テネラから精製したB抗原の本試料の免疫原性活性を実施例15に記載した通り測定した。生後2日のブロイラー用ひな鶏をミョウバンに吸収させた精製した天然B免疫原10μgを含む試料（最終濃度0.4%）で2、9及び16日目に筋

表 19

天然B型免疫原を用いた鶏のコクシジウム症に対する防御

チャレンジ投与量 ($\times 10^{-3}$)	免疫感染	非免疫感染
5	1.36	3.41
10	1.64	3.57
15	1.54	3.44

E. テネラ由来のB免疫原を精製する別の方法はSO7-CheYタンパク質に対する抗体を使用するアフィニティークロマトグラフィによる。この目的のために2本の親和性カラムを調製し、1本はSO7-CheY抗原で免疫する前に除去したウサギの血清（プレブリードカラム（prebleed column））を使用し、1本は実施例2に記載した免疫法を用いてSO7-CheY抗原で免疫にした同じウサギからの抗血清を使用した。SO7-CheY免疫原を実施例13に記載した通り調製した。免疫プロブリンIgG分画を（コーティア等、ジ

ュー、イムノル、メト) (Corthier et al. J. Immunol. Met.) 第66巻75~79頁(1984年)の方法を使用して各血清4mlから調製した。各カラムに対して1g G15mgをシュネイダート等、ジェー、バイオル、ケム (Schneidert et al. J. Biol. Chem.) 第257巻、10766~10769頁(1982年)の方法を使用してセファロースープロテインA (シグマ) 0.5gに結合した。カップリング効率は75~95%であった。イムノアフィニティー精製については、0.1Mホウ酸塩緩衝液、pH8.1、0.5M NaCl、0.02% NaN₃、0.1mM PMSFにおいて上述した通り調製した(ゲル濾過による精製は用いない)還元カルボキシメチル化抽出液約5mgを同じ緩衝液で平衡させたプレブリードカラムに適用した。カラムをカラム緩衝液3mlで洗浄し、次いで合わせたカラム流動液と洗液を同じ緩衝液で平衡させた抗-S07/CheYに適用した。カラムをカラム緩衝液10mlで洗浄した後3M NaSCNで溶離した。溶出液を0.05M NH₄HCO₃に対して48時間透析した後

凍結した。合計約50μgの蛋白質を最終溶出液中に回収した。

このE. テネラ由来親和性精製B抗原の免疫原性活性を実施例15に記載した通り試験した。生後2日のブロイラーひな鶏にミョウバンに吸収させたイムノアフィニティー精製B型免疫原約0.3μgを含む試料(最終濃度0.4%)を2、9及び16日目に筋肉内経路により3回免疫した。免疫原-ミョウバン複合体をウェイル、バンドブックオブ イクスベリメンタル イムノロジー、ブラックウェル サイエントフィック パブリケーション (Handbook of Experimental Immunology, Blackwell Scientific Publications)、ロンドン A3-11頁(1978年)の操作によって調製した。実験用及び対照用を最終免疫の7日後の23日目に10-30×10³ 胞子形成嚢胞体の経口投与でチャレンジした。チャレンジ7日後、鶏を殺し、盲腸の病変の重篤度をジョンソン及びレイド (Johnson and Reid)、エクスポ. パラシトール (Exp. Parasitol.) 第28巻、30~36

頁の方法により決定した。結果を8羽群に対する平均盲腸病変スコアとして表わし、以下の表に示す。

表 2.0

天然B型免疫原を用いた鶏のコクシジウム症に対する防御

チャレンジ投与量 (×10 ⁻³) 嚢胞体	免疫感染	非免疫感染
10	1.41	3.00
20	1.44	3.43
30	1.59	3.38

実施例17

他のアイメリア種由来B抗原の同定及び単離

プロテアーゼインヒビター (2mg/ml 1~10フェナントロリン、2mg/ml ベンズアミジン、0.002mg/ml PMSF 0.048mg/ml シグマ大豆トリプシンインヒビター、0.048mg/ml

アプロチニン、0.02mg/ml ロイペプチン) のカクテルを含むNET緩衝液 (10mM トリス-HCl、pH8.0、150mM NaCl、5mM EDTA) 中で、5.5×10⁷/ml 濃度の胞子形成オオシスト及び2.6×10⁶/ml 濃度のDEAE-52精製スポロザイトを再懸濁することによってアイメリアアセルブリナ抗原を調製した。ここで試料を同量の2X試料緩衝液 (0.125M トリス-HCl、pH6.8、4% v/v SDS、10% v/v 2-メルカプトエタノール、20% グリセロール) と混合した。試料を3分間煮沸し、十分に破壊されるまで超音波処理し、再び3分間煮沸した。プロモフェノールブルーを0.0025%まで加え、試料を使用時まで-20℃で貯蔵した。

イムノブロッティングのために3×10⁵ 胞子形成オオシスト及び2×10⁶ 胞子小体から得られた抗原をスロット毎に装填し、5~20% SDS-ポリアクリルアミド勾配ゲル (ラエムリ、ネイチュア第227巻、680~684頁、1970年) の電気泳動にかけた。SDS-PAGEによ

り分離したタンパク質をトウビン等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 第76巻4350～4354頁(1979年)の手法によってニトロセルロースに電気泳動で導入した。ニトロセルロースをリン酸塩緩衝食塩水pH7.4中0.5%ゼラチンで1時間遮断し、200mlずつで3回洗浄した後、TEN緩衝液(50mM トリス-HCl、150mM NaCl、5mM EDTA、pH7.4)中0.25%ゼラチンで2回目の遮断を行ない、前のように洗浄した。遮断後、ニトロセルロースを0.25%ゼラチン及び0.05%トリトンX-100を含むTEN緩衝液で1:100に希釈した抗体(E. テネラのB抗原を表わすE. テネラクローンSO7配列を含むCheY融合タンパク質に対して隆起した)20ml中に室温で一晩温置した。フィルターを0.25%ゼラチンを含むTEN200mlで5回各々20分間洗浄した。結合抗体をTEN、0.25%ゼラチン、0.05%トリトン20mlで希釈した¹²⁵I-プロテインAで最終濃度 2×10^5 cpm/mlまで検出した。放射性標識プロテインAとの温置

は室温で1時間行ない、次にフィルターを0.25%ゼラチン及び0.05%トリトンを含むTEN200mlで15分間2回及びTEN200mlで15分間4回洗浄した。洗浄後、フィルターを風乾し、コダックX-omat ARフィルムにさらした。抗原は分子量約 $26 \text{ kD} \pm 3 \text{ kD}$ を有した。

リン酸塩緩衝食塩水(PBS) pH7.6に貯蔵したアイメリアマキシマ胞子形成オオシストを1600xgで10分間遠心分離し、バック細胞沈降物に等しいPBS容量で再懸濁した。この懸濁液に同量のガラスビーズを加えオオシストを200rpmで旋回振盪によって破壊した、ダルスキ(Dulski)、P.及びターナー(Turner)、M.エイビアンディーズス(Avian Diseases)、第32巻、235～239頁1988年。破壊したオオシスト及びスポロシストを遠心分離により1600xgで10分間集めた。次いで沈降物を50%パーコール/1×PBSに再び懸濁し、遠心分離した。純粋なスポロシストを含む沈降物を集め進行させる前にPBSで2回洗浄した。破壊されないオオシスト

をパーコール勾配の上部から集め、洗浄し、必要な場合に全操作を繰り返した。胞子形成材シスト1個当たり約1.5～2個のスポロシストを得た。

プロテアーゼインヒビター(2mg/ml 1～10フェナントロリン、2mg/ml ベンズアミジン0.002mg/ml PMSF、0.048mg/ml シグマ大豆トリプシンインヒビター、0.048mg/ml アプロチニン0.02mg/ml ロイペプチン)のカクテルを含むNET緩衝液(10mM トリス-HCl、pH8.0、150mM NaCl、5mM EDTA)にスポロシストを 5×10^7 /mlで再懸濁させることによって抗原を調製した。ここで試料を同量の2×試料緩衝液(0.125M トリス-HCl、pH6.8、4% v/v SDS、10% v/v 2-メルカプトエタノール、20% グリセロール)と混合した。試料を3分間煮沸し、十分に破壊されるまで超音波処理し再び3分間煮沸した。ブロモフェノールブルーを0.0025%まで加え試料を使用するまで-20℃で貯蔵した。

イムノブロッティングのために 1×10^6 スポ

ロシストから得られた抗原をスロット毎に装填し、5～20% SDS-ポリアクリルアミド勾配ゲルの電気泳動にかけた(ラエムリ、ネイチュア第227巻、680～684頁、1970年)。SDS-PAGEによって分離したタンパク質をトウビン等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA第76巻、4350～4354頁(1979年)の手法によりニトロセルロースに電気泳動で導入した。ニトロセルロースをリン酸塩緩衝食塩水pH7.4中0.5%ゼラチンで1時間遮断し、200mlずつで3回洗浄した後TEN緩衝液(50mM トリス-HCl、150mM NaCl、5mM EDTA、pH7.4)中0.25%ゼラチンで1時間2回目の遮断を行ない、前のように洗浄した。遮断後、ニトロセルロースを0.25%ゼラチン及び0.05%トリトンX-100を含むTEN緩衝液で1:100に希釈した抗体(E. テネラのB抗原を表わすE. テネラクローンSO7配列を含むCheY融合タンパク質に対して隆起した)20mlに室温で一晩温置した。フィルターを0.25%ゼラチンを含むTEN

200mlで5回20分ずつ洗浄した。結合抗体をTEN 20ml、0.25%ゼラチン、0.05%トリトンで希釈した¹²⁵I-プロテインAで最終濃度 2×10^5 cpm/mlまで検出した。放射性標識プロテインAとの温置は室温で1時間行ない、その後フィルターを0.25%ゼラチン及び0.05%トリトンを含むTEN 200mlで15分間2回、TEN 200mlで15分間4回洗浄した。洗浄後フィルターを風乾し、コダックX-omat ARフィルムにさらした。抗原は分子量約28kD \pm 3kDを有した。

胞子形成オオシストを約 7×10^9 オオシスト/mlを含むPBS中20ml懸濁液として供給した。懸濁液をPMSE中0.1mMで生成した後顕微鏡的試験により残存する無傷胞子小体が約10%以下になるまで氷浴中で超音波処理した。B抗原を含む胞子形成オオシスト超音波処理不溶性画分を4℃で45分間30,000xgで遠心分離により沈降物を集めることによって得た。B-抗原を超音波処理沈降物から還元及びカルボキシメチル化によ

て抽出した。簡単に言えば、沈降物をPBSで3回洗浄し、次いで室温で5Mグアニジン-HCl/0.5Mトリス-HCl、pH8.6、60mlに懸濁させた。次に懸濁液にジチオスレイトール(DTT)400mgを充填し、室温で24時間緩やかに攪拌しながら保持した。次に懸濁液を4℃で60分間30,000xgで遠心分離し、上澄液をアミコンYM10膜による限外濾過によって20mlに濃縮した。濃縮物をDTTに関して4倍モル過剰のヨード酢酸630mgで充填した。直ちに3Mトリス塩基でpH8.6に調節し、室温の暗所で系を2時間保持した後、50mM NH₄HCO₃/0.1mM PMSE/0.02%アジ化ナトリウムに対して48時間透析して透過物にいくつかの変化があった。透析中生成したいくつかの不溶性物質を4℃で30分間30,000xgで遠心分離によって除去した。保持物は全量約30ml中平均で400mgタンパク質/mlを含む還元カルボキシメチル化可溶性画分(RCSF)を構成する。

E. アセルブリナ由来のRCSFは、流出緩衝

液(50mM NH₄HCO₃/0.1%ツイッタージェント/0.1mM PMSE、0.02%アジ化ナトリウム)で平衡にしたセファクリルS-200のカラム(100 \times 2cm)に適用した。合計60画分(5.5ml)を集めた。抗原を含む画分をSDS-PAGE次にE. テネラのB抗原を表わすE. テネラクロンSO7配列を含むCheY融合タンパク質に対して隆起した抗血清を使用するウエスタンブロッティングによって同定した。適当な画分をプールし、限外濾過(アミコン、YM10膜)によって約12mlに濃縮した。次いで濃縮物をSO7融合タンパク質を引き続き注射したウサギの血清から分離したプレブリードIgGで作製される親和性基質を通過させた。通過は4℃で18時間連続再循環によって行なった。B抗原を含むこの工程からの流動液を50mM重炭酸ナトリウム緩衝液で透析濾過(アミコン、YM10膜)してツイッタージェント次にカラム洗液(0.1Mホウ酸ナトリウム、pH8.0/0.5M NaCl、0.02%アジ化ナトリウム/0.1mM PFST)を除去した。最

終容量は約12mlであり、これはウサギ抗-SO7'IgGを含む生物特異性基質に対する充填物(14361-216-2)を構成した。この充填物を4℃で18時間再循環させることによって基質に適用した。

充填液のカラムを流出させた後以下に示した順序で基質を洗浄した。

カラム洗浄5mlずつで2回

10mMトリス-HCl、pH8.0、5mlずつで2回

次いで抗原を10mMトリス-HCl、pH8.0中0.1%ツイッタージェント3-1210mlの重力通過によって基質から脱着させた。溶出液を50mM NH₄HCO₃に対して透析し限外濾過(アミコン、YM10膜)によって5.0mlに濃縮した。タンパク質はSDS-PAGE及び銀染色によって特徴付けられた。

E. マキシマからのB-抗原の精製は、記載したのと同じ指図書に従ったが、セファクリルS-200による前精製は省略した。E. マキシマか

らのRCSF、20 mlをサブアリコート（各々10 ml）した。アリコートをノクチルグルコシドで0.2%までNaClで0.5Mまで充填した後、プレブリードカラムを4℃で18時間再循環させることによって通過させた。この工程からの流動液は抗-SO7 IgGで作製した生物特異性基質に対するカラム充填を構成した。基質の洗浄及び抗原の脱着は上述した通り行なった。流出液を10 mM トリス-HCl、pH 8.0（アミコンYM10膜）で透析濾過してツイッタージェントを除去し4 M 尿素2.5 mlに再構成した（最終生成物 38893-49-3）。生成物はSDS-PAGE及び銀染色によって特徴付けられた。

生物特異性基質をバテル等の方法に基づいて調製した。上記参照。この1, 1-カルボニルジイミダゾール活性化保持体は商品名レアクチゲルで市販されている（ピアスケミカル社 ロックフォード、イリノイ）。この保持体の特徴はリガンドの遊離アミノ酸との反応による極めて安定な非電荷N-アルキルカルバメート結合の生成にある。

レアクチゲルは製造者の提案した操作に従って使用した。簡単に言えばレアクチゲルのアセトン懸濁液（50%床容量）5 ccをエコノカラム（バイオラド）に導入し、アセトンから流出させた。次いでイムノグロブリン IgG をカップリング緩衝液（0.1 M NaHCO₃ / 0.5 M NaCl、pH 8.5）

12 mg / 8 ml の溶液として導入した。カラムを封じ横ゆれ台に固定し4℃で一晩保持した。カラムを流出させカップリング緩衝液5 mlで洗浄した。保持体をアミノエタノール50 mlを含むカップリング緩衝液10 mlに懸濁させ、カラムを横ゆれ台に室温で4時間置くことによって急冷を行なった。次いで基質をカップリング緩衝液10 ml、3.5 M ナトリウムチオシアネート6 mlで最後に“カラム洗液”（0.1 M ホウ酸塩緩衝液、pH 8.0、0.5 M NaCl、0.02% アジ化ナトリウム、0.1 mM PMSF）10 mlで洗浄した。

ニワトリをE. アセルブリナから分離したB型免疫原で免疫にし胞子形成オオシストで攻撃した。結果を次の表に示す。

表 21

アイメリアアセルブリナ由来天然B型免疫原を用いたニワトリのコクシジウム症に対する防御
平均病変スコア

攻撃微生物

抗原	E. アセルブリナ*		E. テネラ*	
	試験1	試験2	試験1	試験2
無	2.90	2.40	2.75	2.46
E. テネラ				
組換え体				
B型	1.64	1.65	2.13	1.60
E. アセルブリナ				
B型				
0.1 μg	2.17	1.90	1.61	1.32
E. アセルブリナ				
B型				
0.3 μg	1.90	1.15	2.03	1.36

* 攻撃投与量：E. アセルブリナ $1 \sim 2 \times 10^5$ 、
E. テネラ $2 \sim 5 \times 10^4$

種々のE. テネラ免疫原についてのDNAを含む発現ベクターpJC264の試料はアメリカンタイプカルチュアコレクション(ATCC) 12301パークラウンドライブロックビル、マリーランド(Parklawn Drive, Rockville, Maryland) 20852アメリカ合衆国のブタベスト条約のもとに宿主大腸菌がJM83又はJM109として寄託されている。1987年11月4日にクロンSO7、SO6、SP54及びSO311を含む発現ベクターの試料を寄託し各々受託番号67577、67559、67556及び67558が示された。1987年12月19日にクロンSP59を含む発現ベクターの試料を寄託し、受託番号67594が示された。1988年1月8日にクロンSO216を含む発現ベクターの試料を寄託し受託番号67600が示された。

4. 図面の簡単な説明

第1図はA群クロンの制限地図である。

第2図はB群クロンの制限地図である。

第3図はC群クロンの制限地図である。

図面の浄書(内容に変更なし)

第4図はH群クローンの制限地図である。

第5図はF群クロンの制限地図である。

第6図は p S C l N プラスミドの図である。

第7図はCheY-ANFプラスミドからpJC264プラスミドへの変換について図示している。

第8図はp J C 2 6 4 プラスミドの制限地図である。

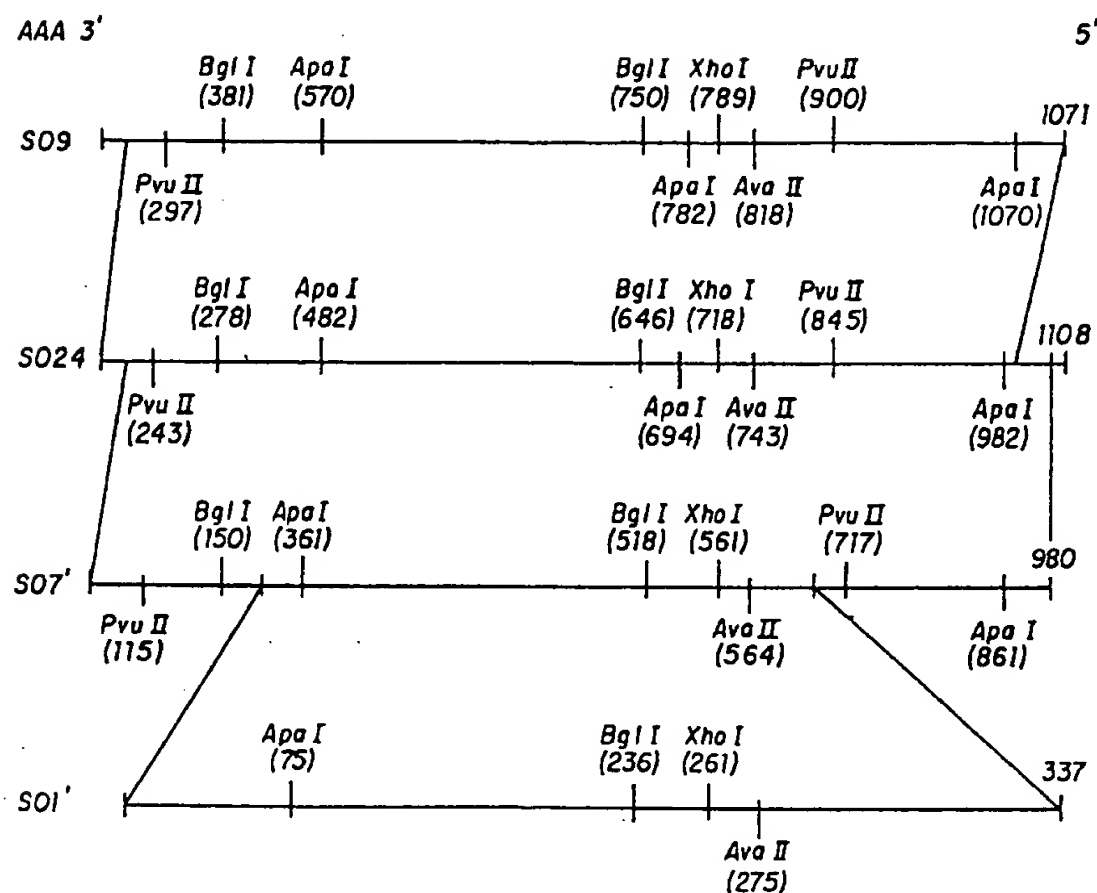
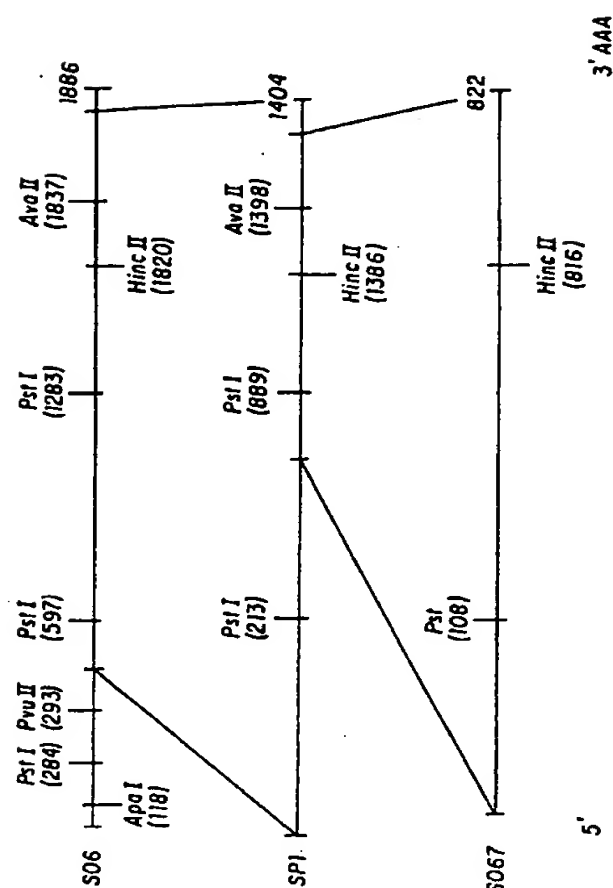
出 願 人 メルク エンド カムパニー
 インコーポレーテッド

代 理 人 岡 部 正

安井幸

井 上 義

加 腰 伸



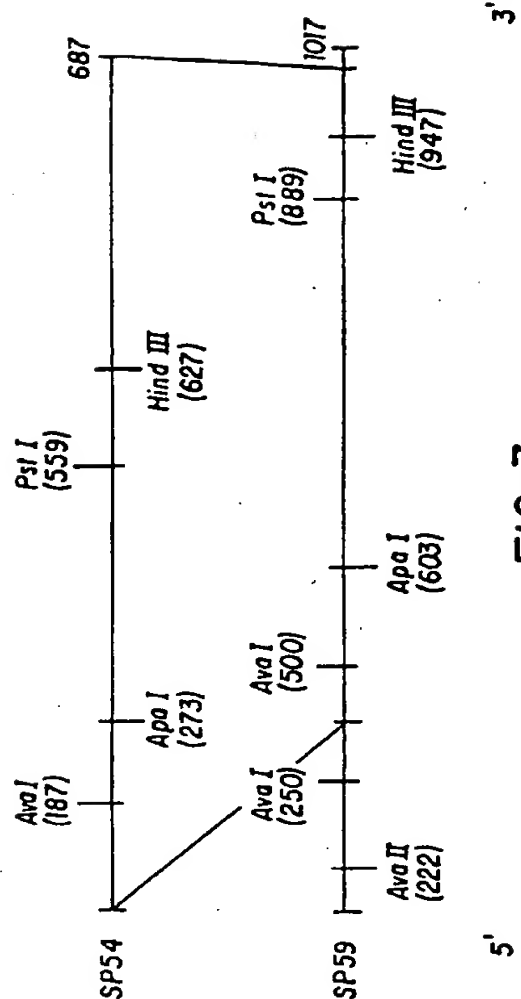


FIG. 3

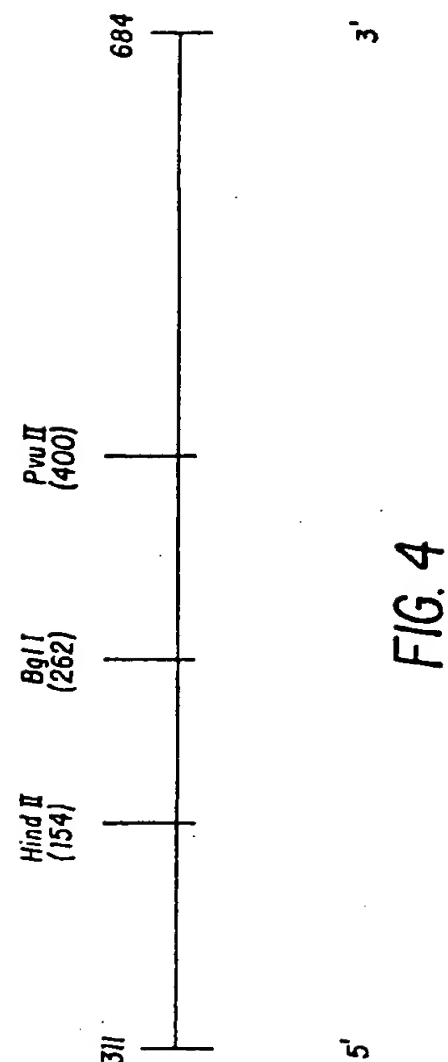


FIG. 4

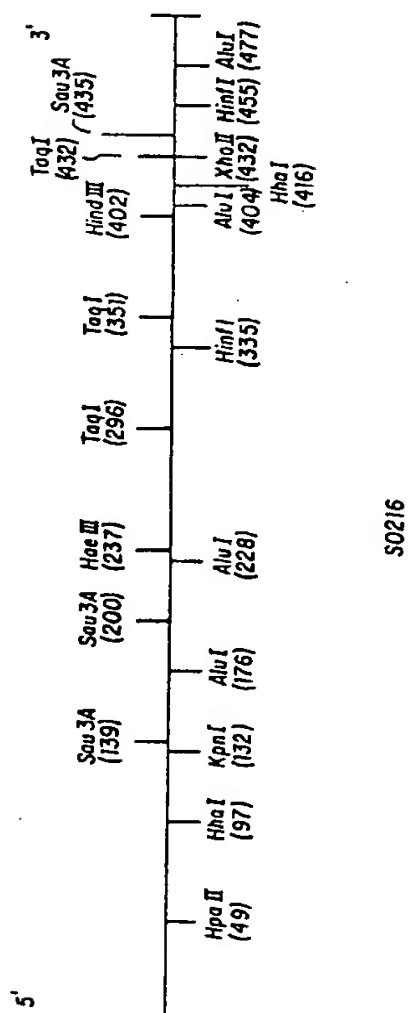


FIG. 5

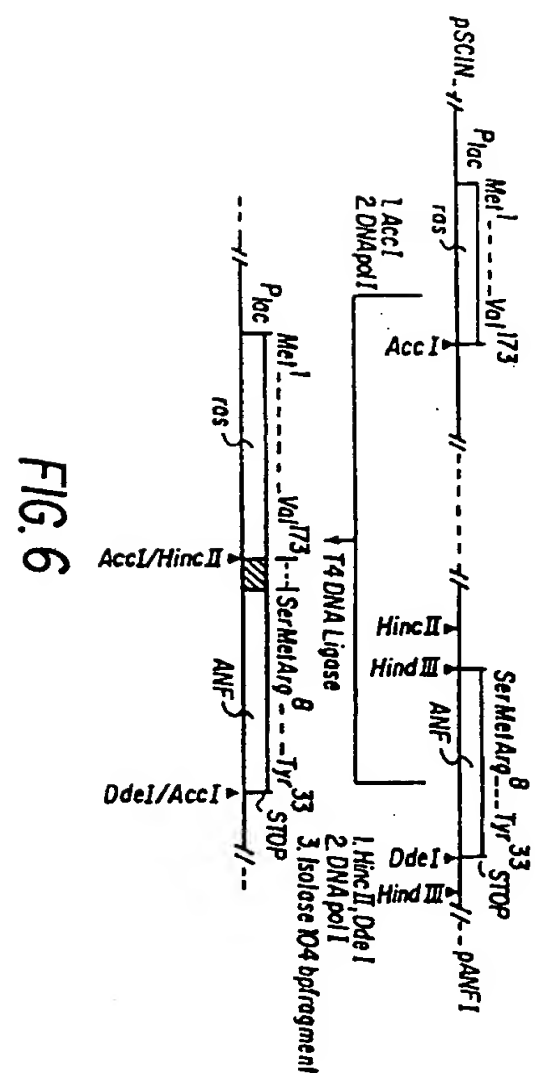


FIG. 6

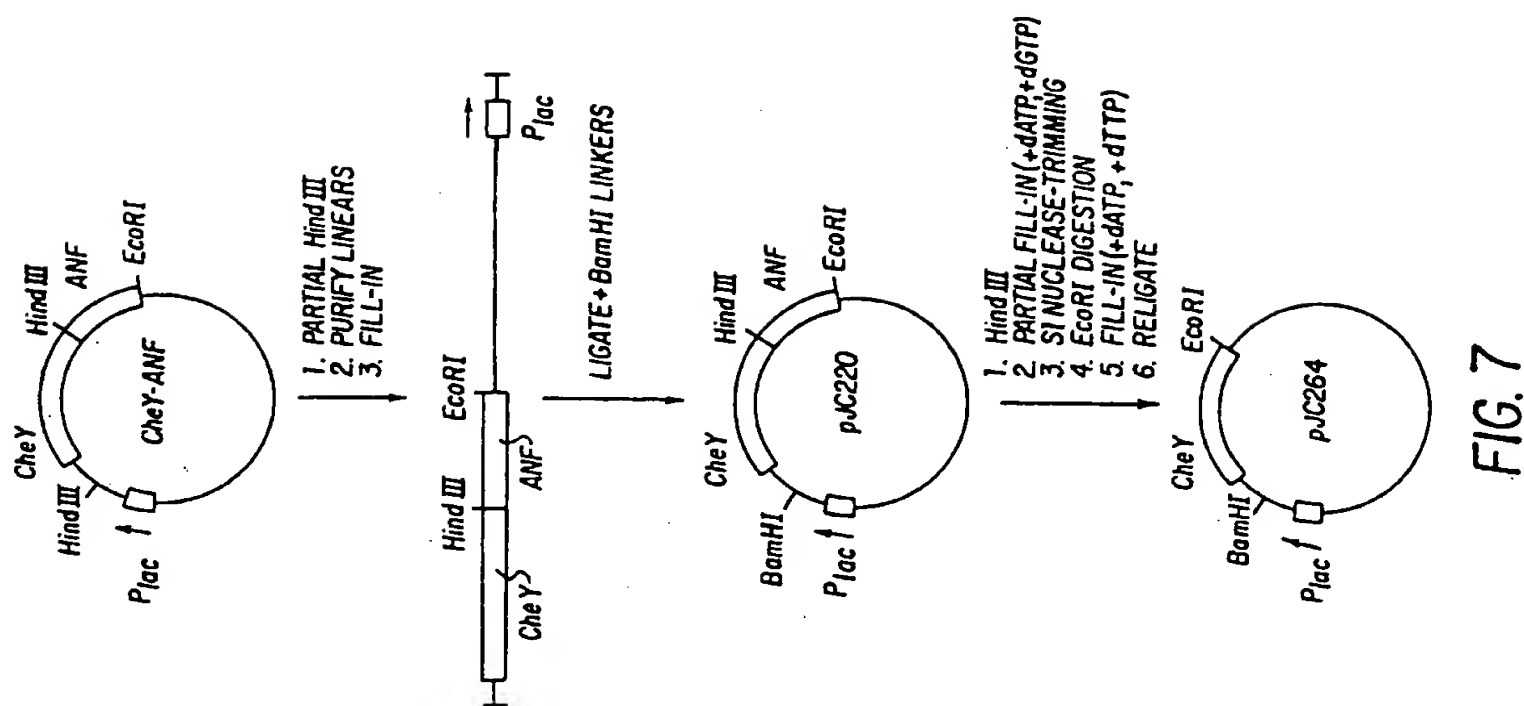


FIG. 7

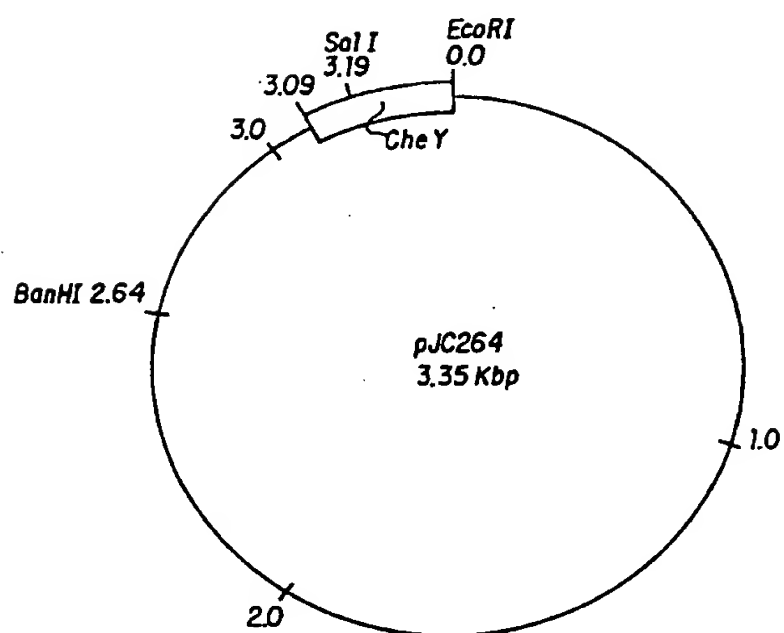


FIG. 8

第1頁の続き

⑤Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号
C 07 K	13/00	8318-4H
	15/04	8318-4H
	15/12	8318-4H
C 12 P	21/02	6712-4B
//(C 12 P	21/02	
C 12 R	1:19)	

優先権主張 ③1988年12月22日③米国(U S)③286,936

⑦発明者 ボール エー. リベレ アメリカ合衆国, 08527 ニュージャージー, ジャクソン,ブリッジ コート 11

⑦発明者 カール エツチ. ノル アメリカ合衆国, 07066 ニュージャージー, クラーク, スタット

⑦発明者 メルヴアイン ジェー アメリカ合衆国, 07090 ニュージャージー, ウェストフイールド, プールヴァード 918

⑦発明者 マーク セント. ジョー アメリカ合衆国, 07090 ニュージャージー, ウェストフイールド, セント ボール ストリート 137

⑦発明者 ヤシュワント デー. アメリカ合衆国, 07023 ニュージャージー, フアンウッド, コリエル アヴェニュー 160

⑦発明者 ブラサンタ アール. アメリカ合衆国, 07076 ニュージャージー, スコッチブレインズ, ニューワーク アヴェニュー 2242

手続補正書 (方式)

平成1年8月3日

- (1) 別紙の通り、明細書1通を提出致します。
- (2) 別紙の通り、正式図面1通を提出致します。

特許庁長官 吉田文毅殿

1. 事件の表示 平成1年特許願第8424号
2. 発明の名称 コクシジウム症ワクチンとして有用な組換え及び天然B群アイメリア・テネラ免疫原

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 アメリカ合衆国, ニュージャージー, ローウエイ, イースト リンカーン アヴェニュー 126

名称 メルク エンド カムパニー
インコーポレーテッド

4. 代理人

住所 〒100
東京都千代田区丸の内3-2-3 富士ビル 602号室
電話(213)1561(代表)

氏名 (6444) 井理士 岡 部 正 夫

5. 補正命令の日付 平成1年6月30日
(発送日: 平成1年7月25日)

6. 補正の対象 (1) 「明細書」
(2) 「図面」

7. 補正の内容 別紙のとおり
明細書及び図面の浄書内容に変更なし



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.